

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NAYARA CRISTINA DOS SANTOS OLIVEIRA



**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DO CARCINOMA MAMÁRIO
LOBULAR E DUCTAL**

CURITIBA

2011

NAYARA CRISTINA DOS SANTOS OLIVEIRA

**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DO CARCINOMA MAMÁRIO
LOBULAR E DUCTAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética,
Departamento de Genética, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal
do Paraná, para obtenção do título de
Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Enilze Maria de
Souza Fonseca Ribeiro

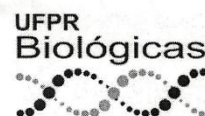
Co-orientador: Prof. Dr. Iglénir João Cavalli

CURITIBA

2011



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **NAYARA CRISTINA DOS SANTOS OLIVEIRA** para fins de obter o título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 25 de fevereiro de 2011

Professor Doutor Cícero Urban
Universidade Positivo - Membro Titular

Professora Doutora Roseli Wassem
UFPR - Membro Titular

Professora Doutora Enilze Maria de Souza F. Ribeiro
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Visto

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Vice-Coordenador do PPGGEN - UFPR
Matr. 176702

Dedicatória

Dedico este trabalho a pessoa mais especial, à minha Mãe, que jamais desistiu e
sempre esteve meu lado, é a razão da minha vida.
Cada conquista minha é também sua!

Agradecimentos

À minha orientadora, **Dr^a Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro** por me aceitar em seu laboratório, tornando meu sonho de trabalhar com Oncogenética possível. Muito obrigada pela confiança e por todo esforço para que este trabalho fosse finalizado.

Ao **Prof. Dr. Iglénir João Cavalli** pela co-orientação e pelas palavras de incentivo e apoio.

À **Prof^a. Dr^a Roseli Wassem**, pelas valiosas sugestões feitas no início deste trabalho.

Ao **Me. Fábio Cordeiro**, pela colaboração fundamental em toda a padronização do experimento, pela imensa paciência e ajuda na identificação das proteínas, meus sinceros agradecimentos.

Ao **Prof. Luciano**, do laboratório de Proteômica do departamento de Bioquímica, que me acolheram possibilitando a identificação das proteínas e conclusão do trabalho.

Aos membros da banca de defesa e acompanhamento, **Prof^a. Dr^a Roseli Wassem**, **Prof. Dr. Cícero Andrade Urban**, **Prof^a. Dr^a Lupe Furtado Alle** e **Prof^a. Dr^a Nina Pagnan**. Obrigada pela disponibilidade e atenção em relação às sugestões e correções.

À **Heloisa M. Zacarron**, que durante este mestrado se tornou uma grande companheira e amiga, das noites de trabalho e estudo. Por sempre estar disposta a me ouvir e que com certeza colaborou muito para a realização deste trabalho. Muito obrigada pela oportunidade de lhe conhecer.

À aluna **Talita**, por ter ajudado no desenvolvimento deste trabalho e pela compreensão nos momentos difíceis.

Às minhas amigas, **Agatha**, **Nalini** e **Fabíola** pela amizade sincera, companheirismo e pelos ótimos momentos de descontração. Fazendo da minha estadia aqui muito mais prazerosa.

Ao meu querido casal de amigos, **Sarah e Marcos** que sempre estiveram dispostos a me ajudar. Agradeço pelo apoio, conselhos, confiança, sobretudo pela amizade verdadeira.

A todo o pessoal do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, pela companhia diária, risadas, conversas e pelas confraternizações. Tornando o ambiente de trabalho ainda mais agradável, com certeza as lembranças serão guardadas com muito carinho.

À minha **Mãe**, por ser meu porto seguro, por representar a razão de todas as minhas conquistas, por sempre exigir o meu melhor e quem sou hoje é com mérito todo seu. Agradeço por acreditar, minha força, meu amor e minha vida! Obrigada.

Ao meu **Pai**, exemplo de força, apesar de muitas vezes longe, soube passar palavras de muita sabedoria. É meu orgulho e força para nunca desistir diante dos obstáculos e conquistar tudo o que sonhar.

As minhas sobrinhas amadas e irmãs, pelo amor incondicional e alegria. E por toda força e incentivo durante toda a minha vida, impulsionando cada conquista.

Ao José, por todo amor e carinho, tornando o final desta etapa muito mais tranquila do que eu imaginava. Obrigada por estar ao meu lado.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho!

E a Deus, principalmente!

"O bem próprio do homem é a atitude da alma dirigida pela virtude. E como há muitas virtudes, a alma deve ser dirigida pela mais elevada e perfeita de todas: a Sabedoria."

Aristóteles

RESUMO

O câncer de mama apresenta uma alta incidência, aparecendo como o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. Apesar de ser considerado um câncer de bom prognóstico, se diagnosticado e tratado precocemente, as taxas de mortalidade no Brasil são elevadas provavelmente porque a doença é diagnosticada em estágios avançados. As pesquisas sobre o diagnóstico e tratamento desta doença permitiram avanços que refletiram na melhora do prognóstico e sobrevida destas pacientes nas últimas décadas. Entretanto, ainda não são claros os mecanismos básicos da carcinogênese mamária, cujo conhecimento é fundamental para a caracterização de novos marcadores moleculares tanto para o diagnóstico precoce como para o desenvolvimento de terapias específicas. Considerando que as análises proteômicas são de grande valia na identificação das funções biológicas e protéicas, além das inter-relações protéicas, o estudo comparativo do proteoma das pacientes com carcinoma lobular e ductal é uma interessante forma de se identificar proteínas diferencialmente expressas. Neste trabalho foram estudadas seis amostras de carcinomas mamários, três caracterizados como ductais (CD) e três como lobulares (CL). A análise comparativa do proteoma realizada por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas possibilitou a identificação de 30 *spots* estatisticamente relevantes, correspondendo a 26 proteínas diferencialmente expressas entre as pacientes com CD e CL. Funcionalmente estas proteínas estão envolvidas numa série de processos biológicos, como apoptose, resposta ao estresse, organização do citoesqueleto, diferenciação, proliferação, progressão, angiogênese e regulação da divisão celular, que podem desempenhar um papel importante nas propriedades tipo-específicas de cada tumor. Nossos dados reforçam a diferença de expressão de algumas proteínas relatadas em trabalhos anteriores, além de apontar diferenças relevantes entre os dois subtipos tumorais, que devem ser confirmadas em amostras individuais. Como por exemplo, a baixa regulação da proteína de ligação à vitamina D, tropomiosina cadeia alfa-3, triose-fosfato isomerase e endoplasmina, encontrada no CL. Conseqüentemente, o CL difere do CD não somente nas características clínicas e histológicas, mas também no padrão de expressão protéica, fornecendo evidências complexas da inter-relação entre os subtipos histológicos. Os achados protéicos diferenciais tanto do CD quanto do CL podem trazer importantes aplicações clínicas como potenciais biomarcadores, inclusive para terapias direcionadas. No entanto, mais estudos são necessários para compreender as diferenças aqui observadas, quanto a fornecer informações consistentes sobre a correlação destas proteínas com o diagnóstico, tratamento e prognóstico de cada subtipo histológico.

Palavras-Chave: Câncer de mama, carcinoma lobular, carcinoma ductal, proteômica.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of cancer among women, and appears as the second most common cancer worldwide. Although it is considered to have a good prognosis if diagnosed and treated early, its mortality rate in Brazil is high and this is probably because the disease is diagnosed at advanced stages. Research on diagnosis and treatment led to an improved prognosis and survival of patients in recent decades, however the basic mechanisms of mammary carcinogenesis, which are essential for the characterization of new molecular markers useful for early diagnosis and for the development of targeted therapies, are still not clear. Proteomic analysis are valuable in identifying biological and protein functions, as the interrelationships among proteins, and the comparative study of patients with ductal and lobular carcinoma proteome is an interesting way to identify differentially expressed proteins. In this study we evaluated six samples of breast carcinomas, three characterized as ductal (DC) and three as lobular (LC). The comparative analysis were performed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry and enabled the identification of 30 *spots* statistically significant, corresponding to 26 differentially expressed proteins between patients with CD and CL tumors. Functionally, these proteins are involved in a number of biological processes such as apoptosis, stress response, cytoskeleton organization, differentiation, proliferation, progression, angiogenesis and regulation of cell division, which can play an important role in the type-specific properties of each tumor. Our data reinforce differences in protein expression previously reported and suggest important differences among the two subtypes of tumor studied. These findings must be validated in further studies with individual samples. As an example, we found several proteins downregulated in CL tumors: vitamin D binding protein, tropomyosin alpha-3 chain, triose-phosphate isomerase and endoplasmina. This means that CL tumors differ from CD tumors not only on clinical and histological features, but also in the pattern of protein expression, providing evidence for the complex interrelationship among the histological subtypes. The results of differential protein expression in both tumor subtypes can provide potential biomarkers for future clinical applications, including target therapies. However, further studies are necessary to understand the differences in protein expression observed and to provide consistent information on the correlation of these proteins with the diagnosis, treatment and prognosis of each subtype of breast cancer.

Key words: lobular carcinoma, ductal carcinoma, proteomics and breast cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------|--|----|
| FIGURA 01 | MODELO DE INATIVAÇÃO DE GENES SUPRESSORES DE TUMOR..... | 19 |
| FIGURA 02 | ESTRUTURA DA GLÂNDULA MAMÁRIA..... | 25 |
| FIGURA 02 | MODELO HIPOTÉTICO DA PROGRESSÃO DO TUMOR DE MAMA..... | 26 |
| FIGURA 04 | ESQUEMA DAS ETAPAS ENVOLVIDAS NA ELETROFORESE BIDIMENSIONAL..... | 39 |
| FIGURA 05 | ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS ETAPAS QUE INTEGRAM A ESPECTROMETRIA..... | 41 |
| QUADRO 01 | CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS..... | 45 |
| FIGURA 06 | GÉIS BIDIMENSIONAIS DA AMOSTRA CP 638..... | 56 |
| QUADRO 02 | DOSAGEM DE PROTEÍNAS EM CADA CONDIÇÃO..... | 57 |
| QUADRO 03 | DOSAGEM PROTÉICA..... | 57 |
| FIGURA 07 | GEL BIDIMENSIONAL DA AMOSTRA CP 638..... | 58 |
| QUADRO 04 | NÚMERO DE <i>SPOTS</i> DETECTADOS NOS GÉIS BIDIMENSIONAIS..... | 59 |
| FIGURA 08 | GÉIS DE REFERÊNCIA DO CARCINOMA LOBULAR..... | 60 |
| FIGURA 09 | GÉIS DE REFERÊNCIA DO CARCINOMA DUCTAL INVASOR..... | 61 |
| FIGURA 10 | MAPAS PROTEÔMICOS BIDIMENSIONAIS..... | 64 |
| GRÁFICO 01 | CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS DE ACORDO COM SUA FUNÇÃO BIOLÓGICA..... | 74 |
| FIGURA 11 | DETALHES DOS <i>SPOTS</i> CORRESPONDENTES A PROTEÍNA TROPOMIOSINA CADEIA ALFA-3 DIFERENCIALMENTE EXPRESSA ENTRE O CD E CL..... | 77 |
| FIGURA 12 | IMAGEM TRIDIMENSIONAL DOS <i>SPOTS</i> DA TPM3..... | 78 |
| FIGURA 13 | DETALHES DOS <i>SPOTS</i> CORRESPONDENTES AS TUBULINAS DE CADEIA ALFA..... | 79 |
| FIGURA 14 | IMAGEM TRIDIMENSIONAL DOS <i>SPOTS</i> DAS TUBULINAS DE CADEIA ALFA.. | 80 |
| FIGURA 15 | DETALHES DOS <i>SPOTS</i> CORRESPONDENTES A PROTEÍNA TRIOSE- FOSFATO ISOMERASE..... | 85 |
| FIGURA 16 | DETALHES DO <i>SPOT</i> CORRESPONDENTE A PROTEÍNA ENDOPLASMINA..... | 87 |
| FIGURA 17 | IMAGEM TRIDIMENSIONAL DOS <i>SPOTS</i> DA PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE A3..... | 88 |
| FIGURA 18 | DETALHES DOS <i>SPOTS</i> CORRESPONDENTES A PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE A3..... | 89 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 01 - FATORES DE RISCO E RISCO RELATIVO NOS GRUPOS MAIS ACOMETIDOS POR CÂNCER DE MAMA..... | 21 |
| TABELA 02 - PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS IDENTIFICADAS POR PMF EM PACIENTES COM CARCINOMA DUCTAL..... | 67 |
| TABELA 03 - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR PMF EM PACIENTES COM CARCINOMA LOBULAR..... | 68 |
| TABELA 04 - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MS/MS..... | 69 |
| TABELA 05 - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO CD E CL E SUAS PRINCIPAIS FUNÇÕES..... | 70 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL – Microlitro
ATP - adenosina trifosfato
2D - Bidimensional
2D-PAGE - eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
BSA - Albumina de soro bovino
CHAPS - Ciclohexilamino dimetilamônio propano sulfonato
Da - Dalton
DNA - Ácido Desoxirribonucléico
DTT – Ditionitrito
EGFR: Receptor do fator de crescimento epidermal
ESI - Ionização por electrospray
FGF: Fator de crescimento de fibroblasto
g - Grama
GTP - Guanosina trifosfato
GTPase - Enzimas que hidrolisam GTP
h - Hora
HCCA - Ácido α-ciano-4-hidroxibenzoico
HER2/ ERBB2: Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2
IEF - Focalização isoeletrica
INCA - Instituto Nacional do Câncer
IPG - Gradiente de pH imobilizado
kDa - Quilodalton
kV - Quilovolts
kVh – Quilovolt/ hora
LMW – Marcador de massa molecular
m/z - Razão massa carga
mA - Milliampère
MALDI - Desorção por laser ionizante assistida por matriz
mg - Miligrama
min - Minuto
mL - Mililitro
mmol/L – Milimolar
MM - Massa molecular
mRNA - Ácido Ribonucléico mensageiro
MS - Espectrometria de massa
MS/MS - Espectrometria de massa em *tandem*
ng - Nanograma
ns - Nano segundos
pI - Ponto isoeletrico

PMF - Impressão digital de peptídeos (*peptide mass fingerprinting*)

PMSF - Fluoreto de fenil-metil-sulfonilo

ppm – Partes por milhão

rpm - Rotações por minuto

RE: Receptor de Estrogênio

RP: Receptor de Progesterona

SDS - Dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio

Spot – Banda protéica

Spot ID - Identificação das bandas no gel

TCA - Ácido tricloroacético

TFA - Ácido trifluoracético

ToF – Time of flight

Vhr - Voltagem/hora

Δ MM: Variação entre a massa molecular observada e a teórica

Δ pI: Variação entre o ponto isoelétrico observado e o teórico

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA..... | 18 |
| 2.1ASPECTOS GENÉTICOS DO CÂNCER..... | 18 |
| 2.2CARCINOMA MAMÁRIO..... | 20 |
| 2.2.1 Aspectos Epidemiológicos..... | 20 |
| 2.2.2 Fatores de Risco..... | 21 |
| 2.2.3 Aspectos Clínico-patológicos e Classificação dos Tumores de Mama..... | 24 |
| 2.2.4 Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento..... | 31 |
| 2.2.5 Marcadores Moleculares do Câncer de Mama..... | 33 |
| 2.3ANÁLISE PROTEÔMICA..... | 35 |
| 2.3.1 Eletroforese Bidimensional e Espectrometria de Massas..... | 38 |
| 3. JUSTIFICATIVA..... | 43 |
| 4. OBJETIVOS..... | 44 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS..... | 45 |
| 5.1CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA..... | 45 |
| 5.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS..... | 46 |
| 5.2.1 Coleta do Material Biológico e Armazenamento..... | 46 |
| 5.2.2 Extrato de Proteínas..... | 46 |
| 5.3 DOSAGEM DE PROTEÍNAS..... | 46 |
| 5.4 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL..... | 47 |
| 5.4.1 Isoeletrofocalização..... | 47 |
| 5.4.2 Equilíbrio das Tiras IPG..... | 47 |
| 5.4.3Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS (SDS-PAGE)..... | 48 |
| 5.5COLORAÇÃO, DIGITALIZAÇÃO E ANÁLISE COMPUTACIONAL..... | 48 |
| 5.6 ESPECTROMETRIA DE MASSAS..... | 50 |
| 5.6.1 Preparo das Amostras..... | 50 |
| 5.6.2 Obtenção e Análise dos Espectros de Massa..... | 51 |
| 5.6.3 Identificação das Proteínas por PMF (Peptide Mass Fingerprinting)..... | 51 |
| 5.6.4 Identificação por Espectrometria de massa em tandem – MS/MS..... | 52 |
| 5.6.5 Análise funcional das proteínas..... | 53 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 54 |
| 6.1 ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO..... | 54 |
| 6.2 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO PROTÉICA DO CARCINOMA LOBULAR..... | 54 |
| 6.3 QUANTIDADE DE PROTEÍNA..... | 58 |
| 6.4 ANÁLISE DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS..... | 59 |
| 6.5 ANÁLISE COMPARATIVA DO TECIDO MAMÁRIO DE PACIENTES COM CARCINOMA DUCTAL E LOBULAR..... | 63 |
| 6.6ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA DIFERENCIAL NO TECIDO MAMÁRIO DE PACIENTES COM CARCINOMA DUCTAL E LOBULAR..... | 73 |
| 6.6.1 Proteínas Estruturais..... | 74 |
| 6.6.2 Enzimas Metabólicas..... | 83 |
| 6.6.3 Chaperonas moleculares/ proteínas <i>heat shock</i> | 86 |
| 6.6.4 Regulação da Diferenciação e Proliferação..... | 91 |
| 6.6.5 Proteínas de Ligação..... | 92 |
| 6.6.6 Transporte..... | 93 |

| | |
|--|------------|
| 7. CONCLUSÃO..... | 97 |
| 8. PESPECTIVAS..... | 98 |
| REFERÊNCIAS..... | 99 |
| CAPÍTULO 1 - PADRÃO DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO PROTEOMA DO CARCINOMA MAMÁRIO LOBULAR E DUCTAL..... | 117 |
| APÊNDICES..... | 140 |
| ANEXOS..... | 145 |

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das dez principais causas de morte em todo o mundo, sendo um dos principais problemas de saúde pública em muitos países. Estimativas da incidência mundial em 2002 revelaram que as neoplasias de pulmão (1,35 milhões), mama (1,15 milhões), e coloretal (1 milhão) foram as mais freqüentes (PARKIN *et al.*, 2005). Foi estimado que em 2004, 7,4 milhões de pessoas morreram de câncer, sendo que até o ano de 2015 mais 83,2 milhões terão morrido. Entre as mulheres, o câncer de mama é a causa mais comum de mortalidade, representando 16% das mortes por câncer em mulheres adultas (World Health Organization - WHO, 2008).

No Brasil, estimativas feitas para o ano de 2010, válidas também para o ano de 2011, apontam a ocorrência de 489.270 casos novos da doença, com o câncer de mama sendo o segundo mais incidente na população feminina, responsável por 49.240 novos casos. Para o Estado do Paraná e para a cidade de Curitiba, as estimativas para o ano de 2010 são, respectivamente, 2.990 e 730 novos casos de câncer de mama (INCA, 2010).

O câncer de mama é uma doença heterogênea que apresenta variações genéticas, moleculares e histopatológicas que podem resultar em diferentes respostas clínicas (VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007). Dessa forma, para elucidar os mecanismos envolvidos no processo de iniciação e progressão do câncer de mama, muitos trabalhos vêm sendo realizados nos últimos anos, principalmente na área da proteômica, com o objetivo de que tais informações possam futuramente servir de base para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico, prognóstico e terapias mais eficientes (TLSTY *et al.*, 2004).

Os carcinomas lobulares possuem uma freqüência dentre as mulheres com câncer de mama, em torno de 10-15%, sendo o segundo subtipo histológico mais freqüente. Este tipo de tumor apresenta um padrão histológico único de invasão no tecido normal e baixa densidade das lesões, sendo, neste caso, dificilmente detectada por mamografia e ultrasonografia (WEINSTEIN *et al.*, 2001; QAYYUM *et al.*, 2002). Em contraste com carcinomas ductais, os carcinomas lobulares, tanto *in*

situ como invasivos, apresentam falta de coesão entre as células na sua aparência histológica, e possuem morfologia celular singular, similar ao que se vê em linfomas. Além disso, apresentam perda total de polaridade. A perda da expressão de E-caderina, a mais importante proteína de adesão no epitélio da mama, se reflete na morfologia histológica deste tipo de tumor. Isto implica nas características biológicas dos carcinomas lobulares invasivos, estando associados com o aumento do risco de doença bilateral e de multifocalidade com lesões descontínuas. A perda de adesão também poderia explicar a propensão em desenvolver metástases em sítios não usuais, como o trato gastrointestinal (EL KHOURY *et al.*, 2004; HANBY e HUGHES, 2008). Alguns casos têm sido documentados com baixos níveis de expressão de E-caderina, indicando que outras mutações genômicas ou alterações de expressão de RNA em outros genes envolvidos com adesão célula a célula devem existir nestes tumores (YODER *et al.*, 2007). Outro aspecto é que em relação aos carcinomas ductais, a resposta terapêutica dos carcinomas lobulares é diferente, podendo ser menos responsivos à terapia neoadjuvante (TURASHVILI *et al.*, 2005).

Ocasionalmente, as características dos carcinomas lobulares e ductais se sobrepõem principalmente nos casos de carcinomas mistos. Diante disso, existe a necessidade de identificar novos marcadores para serem utilizados na sua diferenciação já no diagnóstico, sendo que, até o presente, existem poucos marcadores estudados neste sentido (TURASHVILI *e al.*, 2005; TURASHVILI *et al.*, 2007).

Baseado nestas informações, o objetivo principal deste trabalho é comparar o proteoma das amostras de carcinomas lobulares e ductais, e identificar os potenciais biomarcadores que possam futuramente auxiliar no diagnóstico, prognóstico e tratamento, de modo diferencial.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GENÉTICOS DO CÂNCER

O câncer é uma doença genética que ocorre devido a um processo de múltiplas etapas, que resulta da transformação genética e/ou epigenética de uma única célula. A subsequente progressão do tumor é dirigida pelo acúmulo de mutações adicionais e/ou pelo silenciamento epigenético de genes reguladores do crescimento e diferenciação celular que resulta na expansão clonal e seleção dessas células (POLYAK, 2007).

As principais anormalidades genéticas que determinam a formação e progressão tumoral incluem a expressão aumentada de proto-oncogenes, inativação de genes supressores de tumor, alterações nos genes de reparo do DNA, reativação da telomerase e alterações epigenéticas (FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

Os oncogenes são alelos mutados de uma classe de genes conhecida como proto-oncogenes. Seus produtos regulam a cascata de eventos que mantém a progressão ordenada do ciclo celular, divisão e diferenciação (LOURO *et al.*, 2002). São genes dominantes no nível celular, ou seja, a alteração em um dos alelos pode ser suficiente para causar a superexpressão do seu produto e a multiplicação desordenada da célula. Em geral sua ativação ocorre por meio de mutações gênicas ou cromossômicas e passam a apresentar um ganho de função, em que a proteína mutante (oncoproteína) adquire novas características e tem a sua função aumentada (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

Os genes supressores de tumor atuam como reguladores negativos da proliferação celular, restringindo a progressão do ciclo celular e assim bloqueando a diferenciação ou induzindo a morte celular programada (apoptose) (WEINBERG, 1991). Alterações nestes genes são caracterizadas pela perda de função e são consideradas recessivas no nível celular (excessão do *TP53*), uma vez que ambos os alelos devem ser inativados. Podem ocorrer através de mutação gênica, deleção ou silenciamento epigenético (BIËCHE *et al.*, 1993).

A relação entre genes supressores de tumor e o câncer foi inicialmente proposta por Knudson (1971), que estudando o retinoblastoma, elaborou a hipótese

dos dois eventos (“*Two Hits Model*”) mutacionais que são necessários para o desenvolvimento de certos tipos de câncer. No caso dos cânceres hereditários a primeira mutação é transmitida pela linhagem germinativa e a segunda é somática. No caso dos cânceres esporádicos as duas mutações acontecem no tecido somático (FIGURA 1).

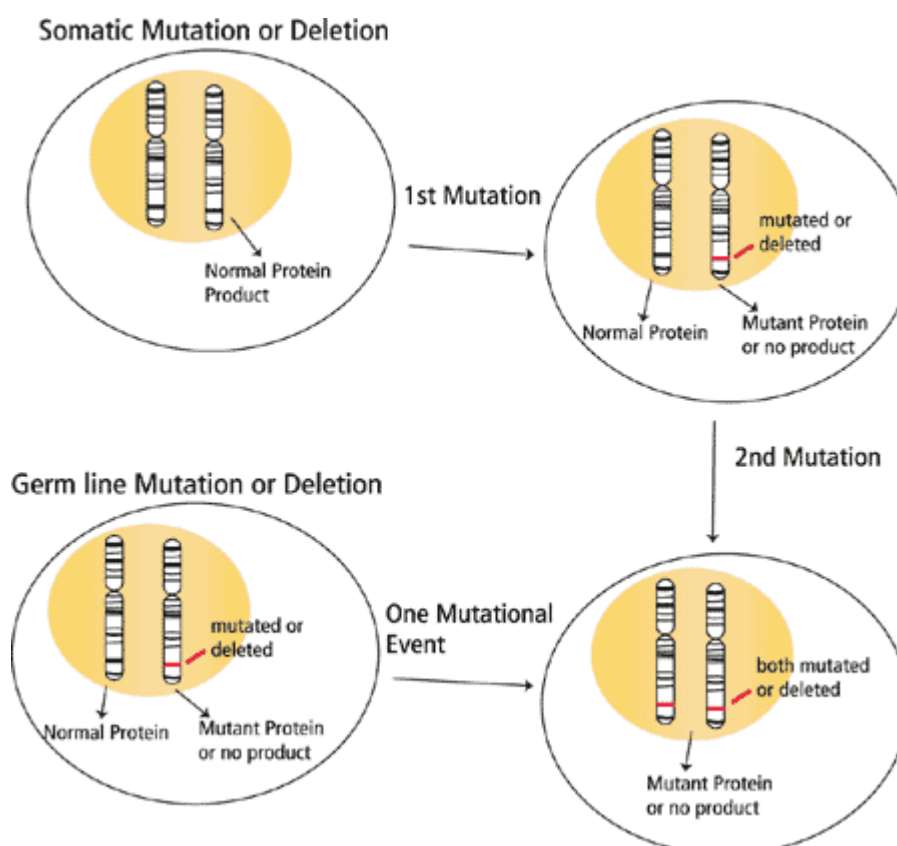


FIGURA 01 - MODELO DE INATIVAÇÃO DE GENES SUPRESSORES DE TUMOR

FONTE - Tumor suppressor gene inactivation or deletion. Disponível em www.sigmaaldrich.com (acesso em 02/04/2011)

LEGENDA: Para o desenvolvimento do tumor, os dois alelos de um gene supressor de tumor devem ser inativados. No câncer hereditário, um alelo mutado de um gene supressor de tumor é herdado através da linhagem germinativa e está presente em todas as células (por exemplo, RBH). Entretanto para iniciar a tumorigênese é necessário que o segundo alelo seja inativado em uma célula somática. Nos casos esporádicos (por exemplo, retinoblastoma esporádico), a inativação dos dois alelos ocorre na via somática por mutação ou deleção.

Além de eventos genéticos, diversos estudos indicam que as alterações epigenéticas têm um papel essencial na gênese de vários tipos de câncer, por alterar a expressão de genes críticos, podendo resultar na expressão aumentada de oncogenes e/ou à inativação de genes supressores tumorais (SHINOZAKI *et al.*, 2005; RODENHISER e MANN, 2006).

A epigenética é caracterizada como um fenômeno que envolve a alteração da expressão gênica por modificação da conformação do DNA, sem que haja alteração da sequência de nucleotídeos (VERMA e SRIVASTAVA, 2002). As principais alterações compreendem anormalidades na metilação (hipermetilação de ilhas CpG de regiões promotoras de genes supressores de tumor em comparação com células normais) e modificações das histonas na cromatina (BAYLIN *et al.*, 2001; ESTELLER *et al.*, 2001; MOMPARTLER, 2003), além de hipometilação genômica global, hipometilação gene-específica de oncogenes e perda de “imprinting” (FEINBERG *et al.*, 2006).

2.2 CARCINOMA MAMÁRIO

2.2.1 Aspectos Epidemiológicos

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de mama corresponde ao segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. No Brasil estima-se para o ano de 2010 a ocorrência de 49.240 casos novos (incidência de 49/100.000). Na região Sul, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres com um risco estimado de 64 casos novos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2010).

O carcinoma mamário é, provavelmente o mais temido, devido à alta freqüência e, sobretudo, por afetar a percepção da sexualidade e a imagem física da mulher. Apesar de ser considerado um câncer de bom prognóstico, se diagnosticado e tratado precocemente, as taxas de mortalidade para o câncer de mama continuam elevadas no mundo todo. A sobrevida média após cinco anos de 61%, muito provavelmente porque a doença ainda seja diagnosticada em estágio avançado, resultando, conseqüentemente, numa alta incidência de mortes (INCA, 2010). Em estudos prévios pode-se demonstrar que a mamografia em mulheres com idade entre 50-69 anos pode reduzir a mortalidade em 15 a 25% (World Health Organization - WHO, 2008).

2.2.2 Fatores de Risco

O câncer de mama é uma doença multifatorial e apresenta uma grande variabilidade clínica e histopatológica. Sua etiologia é complexa, sendo influenciada tanto por fatores endógenos, como as taxas hormonais e predisposição genética, como por fatores exógenos, como dieta, consumo de álcool, uso de contraceptivos orais, entre outros (RADICE e REDAELLI, 2003). A TABELA 01 apresenta os principais fatores de risco envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama e o risco relativo para os grupos mais acometidos.

TABELA 01 - FATORES DE RISCO E RISCO RELATIVO NOS GRUPOS MAIS ACOMETIDOS POR CÂNCER DE MAMA

| Fator | Risco relativo | Grupo de maior risco |
|--------------------------------|----------------|--|
| Idade | >10 | Quanto mais avançada |
| Idade da menarca | 3 | Antes dos 12 anos |
| Idade da menopausa | 2 | Depois dos 55 anos |
| Histórico familiar | ≥2 | Câncer de mama em parente de primeiro grau antes dos 40 anos |
| Idade da primeira gestação | 3 | Nulíparas ou idade da primeira gestação depois dos 40 anos |
| Doença benigna prévia | 4-5 | Hiperplasia atípica |
| Câncer na outra mama | >4 | |
| Dieta | 1,5 | Alta ingestão de gordura saturada |
| Peso corporal | | |
| Pós-menopausa | 0,7 | Índice de massa corpórea >35 |
| Pré-menopausa | 2 | Índice de massa corpórea >35 |
| Consumo de álcool | 1,3 | Consumo excessivo |
| Exposição a hormônios exógenos | | |
| Contraceptivos orais | 1,24 | Uso corrente |
| Terapia de reposição hormonal | 1,35 | Uso ≥10 anos |

FONTE: Adaptado de McPherson K, Steel CM e Dixon JM, 2000. Citado por Oliveira *et al*, 2009.

A idade permanece como um dos principais fatores de risco, mais de 80% dos casos de câncer de mama acometem mulheres com idade igual ou superior a 50 anos de idade, e somente 5% dos casos ocorrem em mulheres com menos de 30 anos de idade. Mulheres com menos de 25 anos de idade apresentam uma incidência de 10 casos a cada 100 mil mulheres, podendo aumentar em até 10 vezes acima de 40 anos de idade (OLDENBURG *et al.*, 2007). Estes dados mostram a importância do rastreamento para o câncer de mama em mulheres com mais de 40 anos.

O tempo de exposição aos hormônios sexuais constitui um fator de risco importante, incluindo os hormônios sexuais endógenos relacionados ao ciclo menstrual (DUMITRESCU e COTARLA, 2005). As mulheres que apresentam menarca precoce, antes dos 12 anos de idade, apresentam um aumento do risco da ordem de 10 a 20%, assim como aquelas que apresentam menopausa tardia, após os 55 anos de idade (PARKIN *et al.*, 2001). Esse efeito é consequência do maior tempo de exposição ao estrogênio endógeno, um ativador da proliferação das células do tecido mamário, ao longo da vida dessas mulheres (KEY, 1999). Além disso, acredita-se que o estrogênio possua um efeito anti-apoptótico nas células expostas a esse hormônio, impedindo a morte programada das células que sofreram danos no DNA, e pode ser em genes que controlam o ciclo celular (NAROD e FOULKES, 2004).

Mulheres que não tiveram filhos (nulíparas) ou as mulheres que tiveram a primeira gestação tardia (após os 40 anos de idade) possuem risco duplicado de desenvolvimento do câncer de mama em relação às mulheres que não apresentam estas características. Este risco diminui em cerca de 30% em mulheres que engravidam pela primeira vez antes dos 24 anos, e gestações adicionais aumentam essa proteção, sugerindo que a gravidez confere proteção ao câncer de mama (CUZICK, 2008). O maior número de filhos e idade precoce da primeira gravidez podem ser alguns dos fatores que explicam a menor incidência do câncer de mama nos países em desenvolvimento em relação aos países desenvolvidos (BRAY *et al.*, 2004).

O histórico familiar representa um fator de risco importante para o desenvolvimento da doença. Mães, irmãs ou filhas de pacientes diagnosticadas com idade inferior aos 40 anos de idade apresentam um risco três vezes maior. O risco é ainda mais elevado quando a paciente é jovem ao diagnóstico ou tem doença mamária bilateral (CUZICK, 2008).

Acredita-se que 90-95% dos cânceres de mama sejam esporádicos (não-familiais) ou decorram de mutações somáticas que se acumulam durante a vida (BALMAIN *et al.*, 2003), e que 5-10% sejam hereditários, explicados por mutações germinativas raras em genes de alta penetrância como o *BRCA1* e *BRCA2*, localizados nos braços longos dos cromossomos 17 e 13, respectivamente (NUSSBAUM *et al.*, 2002). Apesar da incidência do câncer de mama hereditário ser

relativamente pequena, o risco cumulativo de mulheres portadoras de mutações em um dos genes responsáveis por esta predisposição pode chegar a 80% (HABER e FEARON, 1998).

A obesidade na pós-menopausa é um fator de risco devido ao aumento nos níveis endógenos de estrogênio em mulheres obesas, decorrente do fato do tecido adiposo ser fonte de estrógenos. O consumo de álcool também eleva o risco do câncer de mama. O acetaldeído, resultante do metabolismo do álcool, é um carcinógeno que pode promover o desenvolvimento do tumor (DUMITRESCU e COTARLA, 2005). A prática de atividades físicas por adolescentes e mulheres jovens, representa um papel importante na proteção contra diversas formas de neoplasias, diminuindo o risco do câncer de mama em 20%, este efeito talvez seja resultado do atraso no início da menarca e alteração dos níveis hormonais decorrentes do exercício (HANKINSON *et al.*, 2004; LAGERROS *et al.*, 2004).

Em relação ao uso de contraceptivos orais e o aumento do risco de câncer de mama, estudos demonstram que certos subgrupos de mulheres, apresentam um maior risco, particularmente as que iniciaram o uso de pílulas anticoncepcionais em idade precoce; usaram com dosagens elevadas de estrogênios e/ou por longo período de tempo (PARKIN *et al.*, 2001). KAHLENBORN *et al.* (2006) confirmam esta afirmação em meta-análise de 39 estudos do tipo caso-controle, mostrando um aumento pequeno mas estatisticamente significativo (OR=1,19; IC 95% 1,09-1,29) quando estas mulheres são comparadas com as que nunca fizeram uso de contraceptivos orais. O tratamento de reposição hormonal (TRH) em mulheres na menopausa permanece controverso, mas publicação recente das Sociedades de Endocrinologia (SANTEN *et al.*, 2010) chega ao consenso de que os benefícios da reposição hormonal ultrapassam os riscos, incluindo o de carcinomas mamários. Em especial, parece haver aumento do risco para mulheres tratadas com estrogênio e progesterona, que entraram recentemente na menopausa. Enquanto o uso somente do estrogênio não aumenta o risco, que inclusive diminui naquelas que entraram na menopausa há vários anos.

2.2.3 Aspectos Clínico-patológicos e Classificação dos Tumores de Mama

A mama é composta por duas porções distintas: o parênquima e o estroma mamário. O estroma consiste em tecido conjuntivo, colágeno e tecido adiposo, com a função de sustentação da mama. O parênquima é constituído pela porção secretora que é formado por 15 a 20 lobos mamários. Cada lobo mamário é constituído por um número variável de pequenos lóbulos (BIRNBAUM *et al.*, 2004). Estes consistem numa rede de ductos e de pequenos alvéolos, os quais são revestidos por uma camada interna de células epiteliais luminas. Ao redor delas, ocorre uma camada externa de células mioepiteliais, capazes de contrair em resposta à ocitocina, durante a lactação, e que segrega na lâmina basal separando o parênquima mamário do estroma (FIGURA 02) (WOODWARD *et al.*, 2005).

As células lobulares originam estruturas acinares secretórias ao final dos ductos e, durante a gravidez e a lactação, tais células são capazes de produzir as proteínas do leite. Cada lóbulo é composto por um ducto terminal e seus ácinos. A região final dos ductos, que se associa com as estruturas acinares, é designada de unidade terminal ducto-lobular (TDLU), que são consideradas as unidades funcionais da mama (FIGURA 02) (WARRI *et al.*, 2007).

Do nascimento até a puberdade, a glândula mamária cresce num ritmo lento, sob influência das células do estroma, uma vez que, neste momento, tais células não expressam o receptor de estrógeno alfa (RE α) (WARRI *et al.*, 2007).

No início da puberdade, a glândula mamária sofre algumas modificações a cada ciclo menstrual, tanto na expressão gênica quanto na morfologia. A proliferação celular e o número de ácinos por lóbulo aumentam, sob influência dos níveis crescentes dos hormônios estrogênio e progesterona, gerando edema lobular. Nesta fase as estruturas designadas de TEBs (*terminal end buds*), que ocorrem no final dos ductos, sofrem um rápido crescimento e diferenciação (WOODWARD *et al.*, 2005).

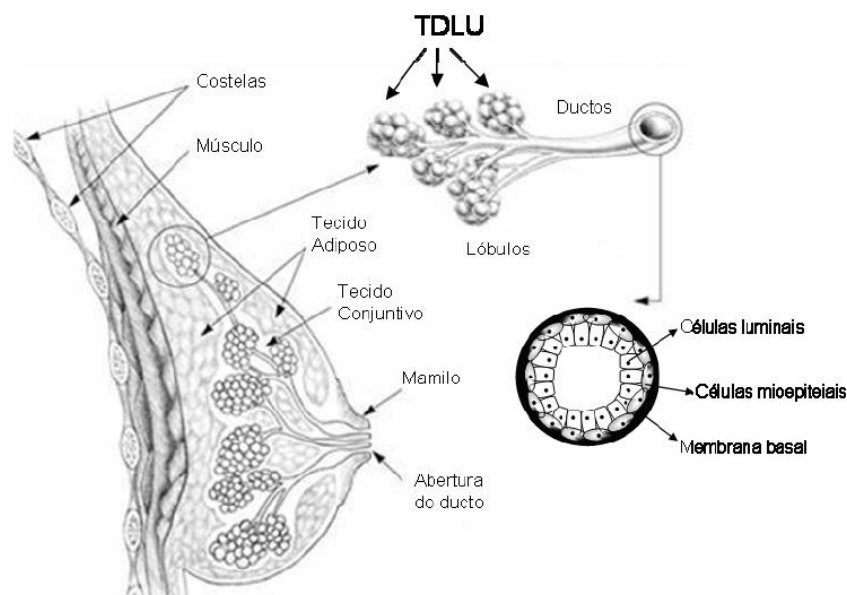


FIGURA 02 - ESTRUTURA DA GLÂNDULA MAMÁRIA.

FONTE - Adaptado de DIMRI, BAND e BAND, 2005.

NOTA - As TDLUs (unidades terminais ducto-lobulares) são compostas por células ductais e acredita-se que nestas unidades surge a maioria dos tumores de mama. O estroma é composto por tecido adiposo e fibroblastos. A mama normal é caracterizada pela presença de duas linhagens: epitelial luminal e mioepitelial.

A camada de células ao redor das TEBs pode originar células mioepiteliais ou epiteliais luminais; no entanto são estruturas temporárias (WOODWARD *et al.*, 2005). Baseada nessas informações, é formulada a existência de células tronco epiteliais mamárias responsáveis pela formação de novas estruturas durante o desenvolvimento da mama (CLARKE e FULLER, 2006). Essas células tronco podem estar sujeitas a desenvolver lesões pré-malignas, desencadeando o câncer.

A progressão dos carcinomas mamários, inclui estágios clínicos e patológicos, inicia com hiperproliferação ductal, com evolução subsequente para carcinoma *in situ* e invasivo, e por fim leva à doença metastática (FIGURA 03) (POLYAK, 2007). A hiperplasia ductal atípica (HDA), uma lesão pré-maligna caracterizada por camadas de células anormais dentro dos ductos ou dos lóbulos, é considerada precursora do carcinoma ductal *in situ* (CDIS), uma lesão não invasiva que contém células anormais. O CDIS dá origem ao carcinoma invasivo que pode atingir a membrana basal e o tecido adjacente e, posteriormente atingir formas altamente metastáticas, atingindo outros tecidos (POLYAK, 2007; VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007).

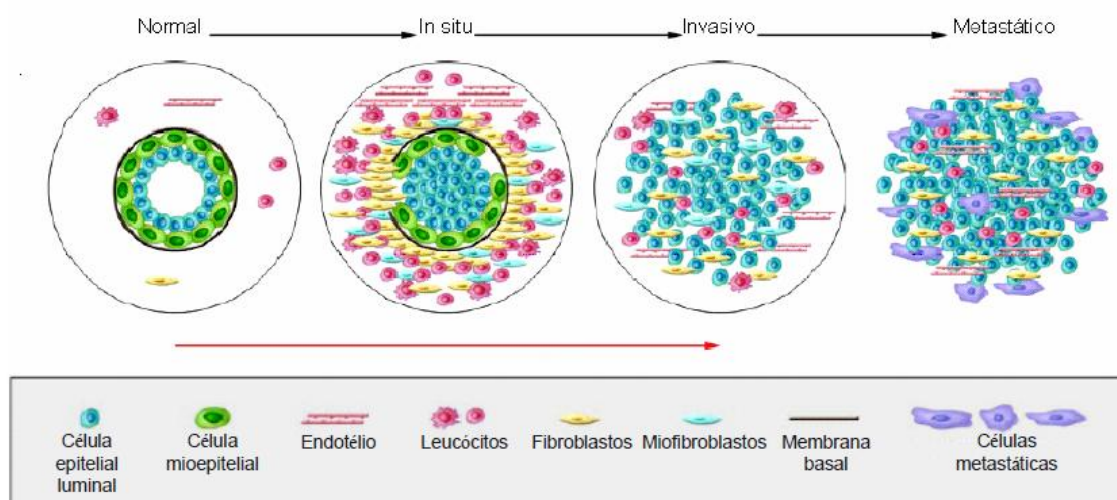


FIGURA 03 - MODELO HIPOTÉTICO DA PROGRESSÃO DO TUMOR DE MAMA

NOTA - Esquema da estrutura ducto-mamária normal, carcinoma *in situ*, invasivo e metastático. Os ductos mamários normais são formados por uma membrana basal composta por uma bicamada de células luminais e mioepiteliais. O estroma mamário é composto por leucócitos, fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais. No carcinoma *in situ* o número de células mioepiteliais diminui devido à degradação da membrana basal, enquanto ocorre o aumento das células luminais. Ao mesmo tempo, o número das células que compõem o estroma aumenta. Quando as células epiteliais rompem os limites da membrana basal resulta no carcinoma invasivo, as células invadem tecidos e migram para órgãos distantes, caracterizam o carcinoma metastático. FONTE - POLYAK (2007).

Na clínica o câncer de mama é classificado com base na extensão anatômica da doença, de acordo com o Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos. Este sistema considera o tamanho do tumor, a presença de metástase nos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza, e na presença ou ausência de metástases à distância. A classificação do grau de diferenciação histológico para os carcinomas mamários invasivos correlaciona as estruturas morfológicas dos tumores com seu grau de malignidade. É baseado na avaliação de três características morfológicas: formação tubular, pleomorfismo nuclear e atividade mitótica. Consideram-se estes parâmetros como; bem diferenciado e com melhor prognóstico (grau I); moderadamente diferenciado (grau II); pouco diferenciado e com pior prognóstico (grau III). O sistema TNM e o grau histológico são classificações significativamente associadas à sobrevivência ao carcinoma mamário e também são importantes fatores de prognóstico (OLDENBURG *et al.*, 2007).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde os carcinomas mamários são classificados, quanto à sua localização e extensão, em carcinoma *in situ* e invasor e, de acordo com a origem, em ductais, que têm seu desenvolvimento nos ductos mamários e representam cerca de 80% dos tumores, e lobulares, que se

desenvolvem no interior dos lóbulos e representando cerca de 10 a 15% dos casos (BOGLIOLO *et al*, 2006; VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007). Outras neoplasias que comprometem as mamas são em geral menos comuns, e incluem tumores mucinosos, inflamatórios, medulares, tubulares ou papilares. Os carcinomas mamários são classificados da seguinte forma:

Carcinoma Ductal *In Situ* (CDIS): também denominado carcinoma intraductal (não infiltrante), é o tipo mais comum de carcinoma não-invasivo e representam um grupo heterogêneo de lesões pré-invasivas com diferentes padrões histológicos, taxas de crescimento e características citológicas (ELLSWORTH *et al.*, 2007). Aproximadamente 25 a 30% dos casos sem intervenção cirúrgica que apresentam focos microscópicos deste carcinoma, podem desenvolver, em um intervalo de 15 anos, o carcinoma invasivo (PAGE e ANDERSON, 1987).

Carcinoma Lobular *In Situ* (CLIS): são caracterizados por uma proliferação de células epiteliais malignas confinadas aos lóbulos mamários, sem evidência microscópica de invasão da membrana basal do estroma vizinho. Clinicamente não é palpável e não é distinguível da mama normal por mamografia ou ultra-sonografia (HEYWANG *et al.*, 1997). A idade média no diagnóstico é de 45 anos de idade e 80 a 90% dos casos ocorrem em mulheres na pré-menopausa. Caracteriza-se pela hiperplasia lobular anormal e multicentricidade (existência de um carcinoma em um quadrante distinto daquele onde está o tumor principal). A evolução do CLIS pode ser bastante variável, cerca de dez a 30% dos carcinomas *in situ*, representa um fator de alto risco para o desenvolvimento do câncer invasor de mama, 50% das vezes se desenvolve na mama oposta à biopsiada (VIANA *et al.*, 2001; BOGLIOLO *et al*, 2006). Baseada nessa evolução, tal lesão é reconhecida como um marcador de tumor, embora alguns autores, recentemente, também lhe tenham atribuído um caráter precursor, indicando a realização periódica de mamografias para as mulheres portadoras.

Carcinoma Ductal Invasor (CDI): representa 80% a 90% dos carcinomas da mama. Tem grande risco de formar metástases em outros órgãos, através da corrente sanguínea ou linfática. Possui o pior prognóstico de todos os tipos ductais, sendo que cerca de 70% formam metástases nos linfonodos axilares. O CDI se inicia em um ducto da mama, encontra a parede do ducto e se espalha para o tecido

gorduroso do estroma. Geralmente aparece como um nódulo pequeno e assintomático, identificado apenas por mamografia.

As principais características genômicas estão mais fortemente associadas ao grau histológico do que ao subtipo histológico. Os CDIs de grau 1 possuem relativamente poucas alterações cromossômicas, as de maior frequência são perdas genômicas em 16q e ganhos genômicos em 1q. Outras alterações incluem ganhos genômicos em 8q, 11q, 16p e 17q, e perdas genômicas em 1p, 8p, 11q, 13q e 22q. Aspectos adicionais de CDIs de baixo grau são: tendência a ser diplóide, apresentar baixa atividade mitótica, ser tipicamente receptor de estrógeno (ER) positivo, na maioria das vezes não possuir amplificação de *ERBB2* (*Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2*) e freqüentemente apresentar aumento de expressão de ciclina D1 (YODER *et al.*, 2007).

Em contraste os CDIs de alto grau (grau 3) possuem mais extensas e complexas alterações genéticas. As alterações mais freqüentes são ganhos genômicos em 8q, 17q e 20q, perdas em 17p e 16q. Outras alterações genômicas comumente relatadas em CDIs grau 3 são ganhos em 1q (numa proporção bem menor do que em tumores de grau 1), e perdas em 1p, 19p e 19q. Estes tipos de tumor tendem a ser ER negativos, tem freqüentemente perda de função de *TP53*, expressão aumentada dos genes *MYC* e *ERBB2*, aneuploidia e alto índice mitótico (YODER *et al.*, 2007).

Carcinoma Lobular Invasor (CLI): microscopicamente, caracteriza-se por apresentar pequenas células dispostas num arranjo linear com tendência a crescer ao redor dos ductos e lóbulos. Representa de 10 a 15% dos casos, possui bom prognóstico e sobrevida de dez anos em 80 a 90% dos casos. Este tipo de tumor pode se apresentar como uma massa palpável assim como os carcinomas ductais ou então como lesão mal definida e difusa, com multifocalidade e multicentricidade, o que dificulta sua detecção e diagnóstico inclusive pela mamografia e ultrasonografia (BIGLIA *et al.*, 2007). Muitos autores estabelecem subtipos de carcinoma lobular invasivo, sendo eles: sólido; alveolar; pleomórfico e tubular. Estes subtipos podem aparecer isolados ou associados. Como um grupo, estas lesões variantes apresentam pior prognóstico do que a forma clássica (HANBY e HUGHES, 2008).

O perfil molecular dos CLIs é distinto dos outros tipos de tumores, embora não seja inteiramente único. São considerados de bom prognóstico, pois geralmente são negativos para *EGFR1* (*epidermal growth factor receptor 1*) e *ERBB2*, e positivos para citoqueratinas 1, 5, 10 e 14, ER e PR. Porém, é importante observar que alguns carcinomas ductais apresentam este mesmo perfil. Já em termos de sobrevida, estudos demonstraram características similares entre pacientes com CLI e CDI, que apresentaram sobrevida global de 5 anos, 85,6% e 84,1% dos casos, respectivamente (ARPINO *et al.*, 2004).

Apesar do CLI apresentar um fenótipo bastante favorável, essas pacientes não possuem resultados clínicos melhores do que pacientes com CDI. Decisões quanto ao tratamento devem ser baseadas nas características individuais de cada paciente e biológicas do tumor, e não apenas na sua histologia (ARPINO *et al.*, 2004).

A principal característica molecular dos carcinomas lobulares, envolve principalmente a perda ou diminuição de expressão de genes mapeados na região 16q22.1, onde se encontra o gene da E-caderina (*CDH1*). A perda de expressão ocorre pela combinação de perda de heterozigose, mutação gênica ou silenciamento do promotor que levam à inativação bialélica do gene. O complexo da E-caderina possui importante função nos mecanismos de adesão célula a célula e na manutenção da arquitetura tecidual (WIJNHOFEN *et al.*, 2000). Na glândula mamária normal, que é composta por uma bicamada formada por células luminais e mioepiteliais, a E-caderina é responsável pela adesão entre as células luminais e a perda de expressão deste gene se reflete na morfologia histológica do CLI (HINCK, 2004).

Em contraste com carcinomas ductais, os carcinomas lobulares, tanto *in situ* como invasivos, apresentam falta de coesão entre as células na sua aparência histológica e possuem morfologia celular singular, similar ao que se vê em linfomas; além disso, apresentam perda total de polaridade. A perda de adesão também poderia explicar a metastização para sítios incomuns, tais como leptomeninges, peritônio, medula óssea, trato gastrointestinal e sistema reprodutor feminino, quando comparado com carcinoma ductal invasivo que metastatizam preferencialmente para pulmão, pleura, fígado e ossos. Isto implica que estes subtipos tumorais apresentam vias biológicas distintas. Alguns casos têm sido documentados com baixos níveis de

expressão de E-caderina, indicando que outras mutações genômicas ou alterações de expressão em outros genes envolvidos com a adesão célula a célula devem ocorrer nestes tumores (YODER *et al.*, 2007).

O carcinoma lobular invasivo possui poucas características morfológicas e genéticas que os distinguem do carcinoma ductal invasivo. As modificações clássicas são a perda de 16q e ganho de 1q e, em termos de números gerais de modificações, CLIs se assemelham a carcinomas ductais de grau 1. Estudos moleculares recentes sugerem que existem outras modificações específicas e características observadas em CLIs, sendo uma delas a amplificação do gene do receptor de fator de crescimento de fibroblastos (*FGF*) no *locus* 8p11.2 (HANBY e HUGHES, 2008).

Os carcinomas lobulares invasivos acometem mais comumente mulheres na pós-menopausa com idade igual ou superior a 55 anos de idade e estão correlacionados estatisticamente ao abuso de álcool, como fator de risco (MASTRACCI *et al.*, 2007). Mersin *et al.* (2003) relataram que embora pacientes com CLI tenham idade mais avançada, e alguns parâmetros favoráveis; como tipo histológico de baixo grau e menor propensão a invasão vascular linfática quando comparado com CDIs, as taxas de sobrevida não diferiram significativamente entre os subtipos tumorais, portanto o tipo histológico não foi um fator preditivo ao prognóstico.

Ocasionalmente, as características dos carcinomas lobulares e ductais se sobrepõem principalmente nos casos de carcinomas mistos. Diante disso, existe a necessidade de identificar novos marcadores para serem utilizados na diferenciação entre estes já ao diagnóstico, sendo que, até o presente, existem poucos marcadores estudados neste sentido (TURASHVILI *et al.*, 2005; TURASHVILI *et al.*, 2007). Estes marcadores também seriam úteis na determinação de metástases de carcinomas lobulares em sítios menos comuns como o trato gastrointestinal, onde elas freqüentemente são confundidas com tumores primários e também em infiltrados linfonodais, onde a distinção entre células de carcinomas lobulares e células linfóides pode ser difícil (BIGLIA *et al.*, 2007). Outro aspecto é que em relação aos carcinomas ductais, a resposta terapêutica dos carcinomas lobulares é diferente, podendo ser menos responsivos à terapia neoadjuvante (TURASHVILI *et al.*, 2005).

Tais características fazem com que o carcinoma lobular seja um grande desafio, dificultando, a identificação das bases moleculares da sua heterogeneidade. A diversidade morfológica e citogenética desta neoplasia implicam em algumas características distintas do CDI, tais como a diferença de expressão da E-caderina. Portanto, mais pesquisas precisam ser desenvolvidas nesta área para elucidar alguns aspectos desta neoplasia, como as vias biológicas associadas ao alto risco de doença bilateral e a validação de técnicas para a detecção precoce que possam auxiliar no diagnóstico e tratamento, direcionados para cada tipo de neoplasia.

2.2.4 Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento

A avaliação adequada é importante para detecção em estágios iniciais, como a presença de nódulo palpável na mama e/ou nas axilas, secreção mamilar, deformidades no formato da mama por retrações da pele, alterações da coloração, superfície ou textura da pele da mama ou do mamilo, mudança do tamanho ou do formato do seio, dentre outros. Deste modo, o tratamento precoce, mais efetivo, menos agressivo, com melhores resultados estéticos e eventos adversos reduzidos. Os métodos disponíveis para detecção precoce incluem o auto-exame mamário, exame clínico da mama, ultrassonografia, mamografia e ressonância magnética (SORENSEN e HERTZ, 2003; McEVOY *et al.*, 2004). Se houver lesões suspeitas, deve-se buscar a confirmação do diagnóstico, que pode ser citológica, por meio de punção aspirativa por agulha fina (PAAF), ou histológica, quando o material for obtido por punção, utilizando-se agulha grossa (PAG) ou biópsia cirúrgica convencional (INCA, 2011).

Dentre os testes de imagem, a mamografia continua a ser apontada como o principal método diagnóstico do câncer de mama em estágio inicial, desde que é capaz de detectar alterações ainda não palpáveis. Estudos que avaliaram estes dados confirmam a redução da mortalidade num rastreamento populacional por mamografia anual em mulheres acima de 40 anos de idade. Apesar de ser um método eficaz, a mamografia não exclui o auto-exame e o exame clínico feito pelo ginecologista ou mastologista, já que alguns nódulos, apesar de palpáveis, não são detectados pela mamografia. Em relação ao auto-exame das mamas, recomenda-se a sua realização por todas as mulheres a partir dos 20 anos de idade, pois cerca de

90% das patologias mamárias são detectadas nas fases iniciais pelas próprias pacientes (SHAPIRO *et al.*, 1992).

No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda como principais estratégias de rastreamento populacional o exame mamográfico, pelo menos a cada dois anos para mulheres de 50 a 69 anos de idade, e o exame clínico anual das mamas, para mulheres de 40 a 49 anos de idade. Para mulheres de grupos populacionais considerados de risco elevado para o câncer de mama (como a história familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau), recomenda-se o exame clínico da mama e a mamografia anualmente, a partir de 35 anos de idade (INCA, 2010).

O acometimento dos linfonodos axilares, o tamanho do tumor e o tipo histológico (fatores anatômicos), o grau histológico, necrose tumoral e índice mitótico (características patológicas quantitativas), os níveis de progesterona e estrógeno (responsividade endócrina), e a competência imunológica do portador da doença constituem os principais parâmetros empregados para a determinação do prognóstico do câncer de mama (VIANA *et al.*, 2001; BOGLIOLO *et al.*, 2006).

Os linfonodos axilares são os primeiros sítios de metástases no câncer de mama, o que os torna um importante fator prognóstico, revelando além da metástase local, uma elevada probabilidade de metástases à distância, que pode atingir órgãos como ossos, fígado, pulmão e cérebro (CLARKE e FULLER, 2006). Estudos demonstram uma relação direta de tais fatores com a sobrevida e estratificam as pacientes em quatro grupos, com base em dados do *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP)*: linfonodos negativos; 1 a 3 linfonodos acometidos; 4 a 9; e 10 ou mais linfonodos positivos. A sobrevida em 5 anos é de 83% para pacientes com comprometimento axilar negativo, 73% se há 1 a 3 linfonodos acometidos, 46% para 4 a 9 e mais de 10 linfonodos acometidos (SILVA *et al.*, 2006).

As modalidades terapêuticas para o câncer de mama incluem as cirurgias (tumorectomia, quadrantectomia, mastectomia radical) e a radioterapia para o tratamento regional, a quimioterapia e a hormonioterapia para o tratamento sistêmico. O tratamento deve ser realizado por uma equipe multidisciplinar visando à terapia integral do paciente (BARROS *et al.*, 2001; VIANA *et al.*, 2001;).

No Brasil, aproximadamente 70% dos casos de câncer de mama são diagnosticados tardiamente, o que demonstra a falta de um programa de

rastreamento que incluía a realização de exame clínico das mamas, mamografia anual e a identificação de grupos populacionais com risco elevado para o desenvolvimento da doença (SCHWARTSMANN, 2001; GONÇALVES *et al.*, 2007). Os fatores que mais influenciam na sobrevida da paciente estão relacionados ao tamanho e o estágio tumoral (SOERJOMATARAM *et al.*, 2008). Estima-se que a sobrevida média geral cumulativa, após cinco anos, seja de 73% nos países desenvolvidos e de 57% nos países em desenvolvimento (INCA, 2010).

2.2.5 Marcadores Moleculares do Câncer de Mama

As características moleculares dos diversos tumores são estudadas e exploradas com o objetivo de determinar o risco de desenvolvimento da doença, o prognóstico global e a resposta aos tratamentos (quimioterapia e radioterapia). A classificação molecular do câncer de mama baseia-se na presença dos receptores hormonais (RH), como o receptor de estrogênio (RE) e o receptor de progesterona (RP), e na amplificação do oncogene *ERBB2* (*HER2*) que codifica para o receptor tipo 2 do fator de crescimento epitelial humano (*Epidermal growth factor Receptor-type 2*) (MULLAN e MILLIKAN, 2007).

A presença desses marcadores tem sido interpretada como fator prognóstico e preditivo de resposta terapêutica. Os RH são proteínas que se ligam aos hormônios circulantes, mediando seus efeitos celulares. A maioria dos autores demonstra que existe uma associação positiva entre a presença de RH e um prognóstico mais favorável. Cerca de dois terços dos cânceres de mama são positivos para RH. A positividade dos tumores para os RE varia de 60 a 81%, enquanto que para os RP, de 44 a 61%. Esta positividade está altamente associada com a idade da paciente e existe uma relação inversa com o tamanho do tumor, o grau histológico e o pleomorfismo nuclear (EINSENBURG e KOIFMAN, 2001). Carcinomas com receptores de estrógenos e/ou progesterona positivos apresentam melhor evolução clínica. Em relação ao oncogene *ERBB2* (ou *HER2*), sua amplificação está associada com pior prognóstico, estando relacionada com elevação do risco para recidivas e metástases (BOECKER e BUERGER, 2003).

O gene *HER2*, localizado no cromossomo 17q21, está super expresso em cerca de 20% dos cânceres de mama em geral e em 25% dos carcinomas ductais,

índices que podem ser maiores nos pacientes com linfonodos positivos, apresentando um pior prognóstico (EINSENBURG e KOIFMAN, 2001). Esse oncogene codifica uma glicoproteína transmembrana contendo 185 kDa, denominada de p185erb, com atividade intrínseca de tirosina-quinase em sua porção carboxi-terminal homóloga ao receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) (SILVA, SADDI, MOMOTUK, 2002). A proteína HER2, quando ligada aos fatores de crescimento tumoral, inicia uma cascata de reações que promovem a divisão celular e, por consequência, o crescimento tumoral. Em geral, mulheres com carcinoma invasivo HER2 positivo possuem uma doença mais agressiva, com uma probabilidade maior de reincidência, um pior prognóstico e uma sobrevida menor, quando comparadas com as mulheres HER2 negativas (HENRY e HAYES, 2006).

Em 1992, foi desenvolvido o anticorpo monoclonal *Herceptin*, também designado de Trastuzumab, que se liga com grande afinidade ao domínio extracelular da proteína HER2, impedindo a sinalização de proliferação desencadeada pela mesma. O tratamento apenas com *Herceptin* produziu resposta anti-tumoral em 15-20% das pacientes com metástases e, em associação a outros quimioterápicos (doxorrubicina, ciclofosfamida ou paclitaxel), aumentou a eficácia da quimioterapia, com aumento geral da sobrevida (citado por OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Clinicamente, a terapia endócrina com drogas anti-estrógenos ou com inibidores da aromatase são utilizadas nos casos em que os tumores apresentam RE+ (70% dos casos de câncer de mama). Assim o anti-estrógeno *Tamoxifen* liga-se ao receptor tornando-o não funcional, enquanto os inibidores de aromatase reduzem os níveis de estrógenos. A maioria dos tumores RE+ são inicialmente responsivos ao *Tamoxifen*. Os inibidores de aromatase tais como o *Anastrozol* e *Letrozol* são especialmente usados em pacientes que se tornam resistentes ao *Tamoxifen*. Entretanto, existem pacientes que se tornam resistentes a essas duas abordagens de tratamento (IKEDA e INOUE, 2004).

É importante também avaliar o papel das proteínas *BRCA1/2* no reparo de DNA. A ausência dessas proteínas usualmente resulta em deficiência no reparo de danos na dupla fita (DSB) (*double-strand breaks*) por recombinação homóloga, levando à instabilidade genômica e predisposição ao câncer. Dados bastante interessantes têm sido publicados recentemente sobre o aumento da sensibilidade das células defectivas na recombinação homóloga, isto é, células com perda da

funcionalidade do *BRCA1*. Estes estudos apresentam a extrema sensibilidade das células deficientes de *BRCA1/2* aos inibidores da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) (FARMER *et al.*, 2005; McCABE *et al.*, 2006). As proteínas PARP1/2 possuem um importante papel no processo de reparo do DNA, em especial no reparo por excisão de bases (BER), utilizado pelas células deficientes em *BRCA1/2*, sendo que a ausência da atividade da PARP resultaria no aumento no número de lesões. O reparo por recombinação homóloga é um mecanismo conservativo de reparo, isto é, a seqüência original é restabelecida e é provável que na ausência de *BRCA1/2* a célula passe a usar mecanismos não conservativos, gerando mutações e contribuindo para o fenótipo tumoral. A seletividade dos inibidores PARP para as células deficientes em *BRCA1/2* pode ser entendida como uma interação sintética letal (HARTWELL *et al.*, 1997). A letalidade sintética entre dois genes ocorre quando a perda da função de um dos genes (PARP ou *BRCA1*) é compatível com a viabilidade celular, mas a perda de ambos é letal. Vários estudos pré-clínicos estão em andamento, alguns já em fase III, combinando diversos inibidores de PARP a células com deficiência no reparo do DNA, tais como células deficientes em *BRCA1/2* (ROULEAU *et al.*, 2010). Apesar de essas pesquisas demonstrarem que a inibição da PARP pode ser útil na abordagem terapêutica como um agente antitumoral, deve-se acumular um maior conhecimento sobre a biologia básica destas moléculas, como a completa estrutura e os mecanismos moleculares de ativação pelo dano do DNA.

2.3 ANÁLISE PROTEÔMICA

Nas últimas décadas, enormes avanços na biologia molecular foram alcançados, com o seqüenciamento em larga escala de diversos genomas, incluindo o Projeto Genoma Humano (VENTER *et al.*, 2001). O seqüenciamento do genoma gerou uma quantidade imensa de informações, sugerindo possíveis modos de expressão dos genes, porém por si só, não revela dados sobre eventuais modificações pós traducionais e, nem do controle da atividade em resposta a condições particulares (citado por CHAVES, 2004). Torna-se claro que apenas o entendimento genômico não permite a compreensão completa a respeito dos diversos mecanismos fisiológicos ou patológicos que operam nos organismos. Isto

se deve ao fato da sequência gênica indicar um estado estático da informação genética, enquanto que as respostas celulares às mais diversas situações são extremamente dinâmicas (HONDERMARCK *et al.*, 2008).

Com a necessidade de suprir esta demanda de conhecimentos, as análises da expressão gênica através dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) ou dos níveis protéicos, tornaram-se ferramentas importantíssimas. Entretanto, a análise dos níveis de RNAm não correspondem necessariamente com a abundância das proteínas, devido à meia vida do RNAm; aos *splicings* que ocorrem no transcrito primário; a ativação ou não da tradução do RNAm para proteína e a ocorrência de modificações pós-traducionais. Estas modificações não são detectadas no nível de RNAm, mas desempenham funções significantes na estabilidade protéica, localização, interações e mecanismos de ação (BERTUCCI *et al.*, 2006).

O termo proteoma foi utilizado pela primeira vez por Mark Wilkins, em 1995, sendo definido como o complemento protéico total do genoma. Entretanto, esse termo também pode ser usado para referir-se ao conjunto de proteínas expresso numa célula ou tecido em um determinado momento e sob determinada condição (GRAVES e HAYSTEAD, 2002).

O grande avanço da análise proteômica é devido não somente à capacidade de identificar seqüências polipeptídicas, mas também à possibilidade de detectar seus níveis de expressão, funções, modificações pós-traducionais, interações entre proteínas e mecanismos regulatórios. Portanto, o proteoma reflete o conjunto de proteínas produzidas por uma célula, ou seja, a expressão funcional do genoma, dependendo do estágio de desenvolvimento e diferenciação, assim como condições específicas e temporais do ambiente. Tais características fazem com que o estudo proteômico seja bastante desafiador, pois a expressão gênica de uma célula é bastante dinâmica, dificultando, em princípio, o uso de métodos automatizados e outras estratégias de larga escala utilizadas no seqüenciamento genômico. Apesar disso, a proteômica é a ferramenta mais apropriada para se entender o funcionamento dos genes, porque analisa o produto final do genoma (PANDEY e MANN, 2000).

As proteínas podem sofrer modificações pós traducionais caracterizadas por fosforilação, acetilação e sulfatação, ou por clivagem de proteínas por proteases sitio-específicas (ALAIYA *et al.*, 2005). Por este motivo, a estrutura final e função das

diversas proteínas não podem ser definidas com base apenas nas seqüências nucleotídicas dos genes que as codificam (CAHIL *et al.*, 2001). Um único gene pode codificar diferentes produtos protéicos, devido ao *splicing* alternativo e diversas modificações pós-traducionais, aumentando substancialmente a complexidade e o número de proteínas codificadas em uma célula (ALAIYA *et al.*, 2005).

O estudo da proteômica, neste contexto, tem uma ampla aplicação: (1) a pesquisa de proteínas globais, entre as aplicações da proteômica a mais desafiadora e a que mais exige recursos, permite realizar uma análise direta e identificar as proteínas presentes no câncer de mama em vez de deduzir a composição do proteoma pela transcriptômica; (2) o perfil de expressão protéica, no qual geralmente é realizada uma análise diferencial, por exemplo, comparando as proteínas expressas no tecido normal de mama com aquelas expressas em tumores e biopsias de linfonodos; (3) mapeamento da rede de proteínas; e (4) caracterização das modificações pós-traducionais, altamente especializadas e que envolvem a determinação da condição e da forma na qual as proteínas interagem umas com outras nos seus ambientes naturais e de que modo as proteínas são modificadas (LIEBLER, 2002; SOMIARI *et al.*, 2005).

Na área do câncer, o sequenciamento do genoma humano trouxe a transferência das metas e expectativas genômicas para a exploração da proteômica (HONDERMARCK *et al.*, 2008). Conseqüentemente, o progresso realizado na análise proteômica, tem contribuído à compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese. Entretanto, a complexidade do câncer tem limitado o progresso da oncologia clínica, pois cada tipo de tumor é constituído por um grande número de subtipos com alterações genéticas diferentes, associados a comportamento clínico e resposta terapêutica distintos. As pesquisas de análise proteômica desempenham um papel extremamente importante para intervir no desenvolvimento e progressão do câncer, assim como para identificar e validar novos marcadores biológicos, que possam ser usados como fatores prognósticos e alvos terapêuticos, de forma diferencial (ALAIYA *et al.*, 2005).

Para atender a esses objetivos, a caracterização de determinado proteoma requer métodos analíticos sensíveis para separar, detectar e identificar as proteínas e as possíveis modificações pós-traducionais. Atualmente as principais técnicas

utilizadas na proteômica são a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massa.

2.3.1 Eletroforese Bidimensional e Espectrometria de Massas

Os primeiros estudos proteômicos utilizando eletroforese bidimensional (2D-PAGE) se desenvolveram na década de 1970, por Klose (1975), O'Farrel (1975) e Scheele (1975), que trabalharam respectivamente com o mapeamento de proteínas em camundongo, em *Escherichia coli*, e em uma outra espécie de roedor (GRAVES e HAYSTEAD, 2002). Na metodologia 2D-PAGE, de acordo com propriedades físico-químicas independentes, as proteínas são separadas em duas etapas: focalização isoeletrica (IEF) e eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Na primeira dimensão, as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI) por focalização isoeletrica. O pI de uma proteína corresponde ao valor de pH no qual a sua carga elétrica líquida é zero. A técnica consiste em aplicar a amostra em uma tira com gradiente de pH imobilizado, e efetua-se a IEF sob alta voltagem. Uma vez submetidas a um campo elétrico, as proteínas migrarão até encontrar uma faixa de pH referente ao seu pI e neste ponto ficarão com carga total neutra, interrompendo a migração no gel (BERKELMAN e STENSTED, 1998). Após a primeira dimensão, a tira é equilibrada em tampão contendo SDS, para a solubilização das proteínas, sendo então submetidas à segunda dimensão, através da SDS-PAGE, no qual as proteínas são separadas de acordo com sua massa molecular (FIGURA 04).

A eletroforese bidimensional é um método de separação eficiente, porque permite separar simultaneamente centenas ou milhares de proteínas diferentes, possibilitando a análise de amostras, como tecidos e fluídos corporais que são misturas complexas e precisam ser inicialmente separadas para uma análise posterior. O resultado final consiste em um mapa bidimensional (mapa-2D) da amostra, onde as proteínas são separadas com base no seu pI na horizontal, e massa aparente na vertical (WESTERMEIER, 2004). Tal procedimento fornece informações úteis como ponto isoeletrico, massa molecular, expressão, abundância relativa e isoformas, já que, geralmente, elas provocam mobilidade eletroforética

alterada (CASH, 1998; GORG *et al.*, 2000; PANDEY e MANN, 2000; HERBERT *et al.*, 2001; JUNGBLUT, 2001).

Após a separação pela 2D-PAGE, as proteínas são visualizadas no gel através da coloração com Coomassie coloidal. Uma vez obtidos os géis, é realizada a análise da imagem e a análise comparativa, detectando proteínas diferencialmente expressas. Após a detecção, as proteínas são identificadas por meio da espectrometria de massas (MS).

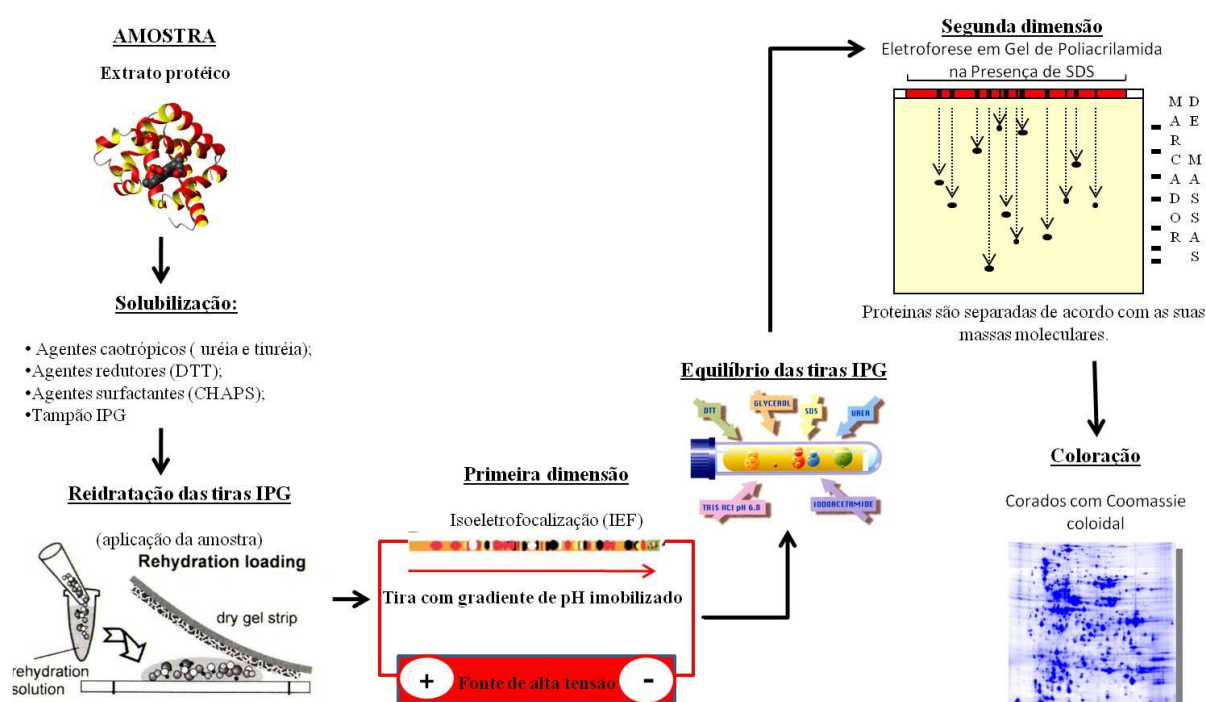


FIGURA 04 – ESQUEMA DAS ETAPAS ENVOLVIDAS NA ELETROFORESE BIDIMENSIONAL
FONTE – Autor (2011)

O princípio da MS é determinar a massa molecular de compostos químicos por meio da ionização e posterior separação de partículas carregadas na fase gasosa, tais como moléculas e átomos, de acordo com sua razão massa/carga (m/z). Os espectrômetros de massa são compostos por uma fonte de ionização, um analisador de massa e o detector.

A utilização em larga escala da espectrometria de massa no estudo proteômico só foi possível devido ao desenvolvimento de técnicas brandas de ionização, tais como ESI (*Electrospray Ionization*) e MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*). Combinadas com um analisador de massas do tipo tempo de voo, ToF (*Time of Flight*) é normalmente utilizado para a realização da impressão

digital de peptídeos (PMF) de proteínas e outras moléculas (BISCH, 2004). Tais metodologias permitiram identificar peptídeos e proteínas, que quando submetidos a outros processos de ionização não permaneciam intactos, por serem moléculas relativamente grandes ou que não resistiam ao calor (ZHU; BILGIN; SNYDER, 2003).

Antes de serem analisados pela espectrometria de massas os *spots*/bandas de interesse são recortados do gel e submetidos a diversas etapas de lavagem, para em seguida as proteínas sofrerem digestão por enzimas proteolíticas, como a tripsina, capazes de clivar a ligação peptídica em seqüências específicas (BISCH, 2004). A tripsina cliva de forma específica, a região C-terminal adjacente aos resíduos de arginina (R) e lisina (K), gerando um conjunto de peptídeos únicos, caracterizando a impressão digital de cada molécula (QUADRONI e JAMES, 2001; CAGNEY *et al.*, 2003) (FIGURA 05).

No espectrômetro MALDI-ToF-MS os peptídeos são cristalizados junto a uma matriz orgânica ácida, a qual é bombardeada com um laser, sendo capaz de absorver a maior parte da energia e transferir apenas parte para a amostra, gerando a ionização desta última. Os peptídeos ionizados, sob um forte campo elétrico, são simultaneamente lançados através de um tubo de vôo, movendo-se de acordo com a relação massa sobre carga (m/z) (MANN; HENDRICKSON; PANDEY, 2001; WY SOCKY *et al.*, 2005). A obtenção das massas dos peptídeos é resultado da medição do “tempo de vôo” que estes íons levam até alcançar o detector. Estabelece-se uma relação de massa com o tempo que a molécula leva para atravessar o tubo. Estas assinaturas espectrométricas são analisadas pelo programa do aparelho, ou outros (MARVIN *et al.*, 2003).

A análise do padrão de massas gerado por cada *spot*, representado por um espectro de massa/carga (m/z) dos diversos peptídeos, se tornou possível a partir da disponibilidade de seqüências genômicas completas, que possibilitou o desenvolvimento da técnica “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF) (FIGURA 05). Nesta técnica, a massa dos peptídeos obtida pela espectrometria de massas representa uma impressão digital da proteína. Dessa forma, os valores das massas dos peptídeos, dados experimentais, podem ser correlacionadas com dados pré-existentes obtidos através de uma clivagem *in silico* utilizando-se os bancos de dados genômicos (MARVIN *et al.*, 2003).

PREPARO DA AMOSTRA PARA MALDI-TOF

- Excisão do spot de interesse
- Descoloração
- Desidratação

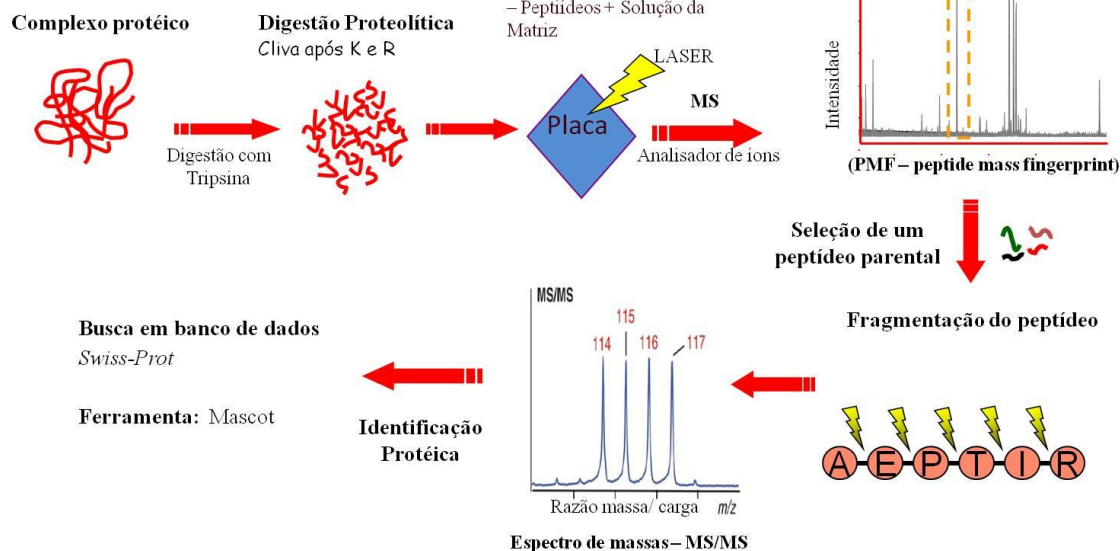


FIGURA 05 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS ETAPAS QUE INTEGRAM A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

FONTE- Autor (2011)

Dependo da complexidade do genoma, um único *spot* pode não representar uma única proteína, por possuírem peptídeos semelhantes, e também as modificações pós-traducionais podem alterar a massa de um peptídeo, não correspondendo mais a mesma proteína. Estas representam algumas das desvantagens, que dificultam a identificação por PMF. Neste caso, segue-se uma nova fragmentação dos peptídeos previamente detectados durante o PMF (chamado de peptídeo parental), são isolados e submetidos à fragmentação por colisão com moléculas de um gás inerte, como: argônio, nitrogênio ou hélio. Assim, permite o seqüenciamento parcial do peptídeo parental, a partir da combinação das massas dos novos fragmentos, são seguidas as análises e o espectro obtido é chamado de espectro de massa em *tandem* ou MS/MS (CANTÚ *et al.*, 2008). Os fragmentos têm as massas medidas e então a seqüência de aminoácidos do peptídeo é resolvida, gerando um dado muito mais robusto à identificação da proteína. A identificação é mais fidedigna, por esta técnica possibilitar o acesso à estrutura primária da proteína. Para aplicação do MS/MS é necessária a utilização de aparelhos mais sofisticados como MALDI TOF-TOF, ESI MS-MS e Q-TOF (GEVAERT; VANDEKERCKHOVE, 2000; GORG *et al.*, 2004). Ao final do processo, é feita a comparação das massas moleculares do espectro experimental, obtida tanto por

PMF quanto por MS/MS, com as massas geradas a partir de um banco de dados de proteína digerido *in silico*, são usados *softwares* de busca para identificar as proteínas, sendo que o MASCOT foi utilizado neste trabalho (FIGURA 05).

Portanto, a abordagem proteômica baseada na espectrometria de massas representa uma ferramenta analítica poderosa para o estudo da expressão protéica do tecido tumoral de mama, especialmente por fornecer dados para a investigação de biomarcadores candidatos, que possam auxiliar no diagnóstico precoce e no tratamento diferencial de cada subtipo tumoral.

3. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama apresenta uma alta incidência, aparecendo como o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, as taxas de mortalidade no Brasil são elevadas provavelmente porque a doença é diagnosticada em estágios avançados. As pesquisas sobre o diagnóstico e tratamento desta doença permitiram avanços que refletiram na melhora do prognóstico e sobrevida destas pacientes nas últimas décadas. Entretanto, ainda não são claros os mecanismos básicos da carcinogênese mamária, cujo conhecimento é fundamental para a caracterização de novos marcadores moleculares úteis tanto para o diagnóstico precoce como para o desenvolvimento de terapias específicas.

Considerando que as análises proteômicas são de grande valia na identificação das funções biológicas e protéicas, além das inter-relações protéicas, o estudo comparativo do proteoma das pacientes com carcinoma lobular e ductal é uma interessante forma de se identificar proteínas diferencialmente expressas. Os dados gerados poderão auxiliar na identificação de novos marcadores moleculares a serem utilizados na diferenciação desses tumores, contribuindo para a detecção precoce, diagnóstico e tratamento mais específico para cada subtipo tumoral, já que até o momento, existem poucos marcadores definidos neste sentido.

4. OBJETIVOS

4.1 GERAL

O objetivo geral deste trabalho é comparar o proteoma representativo das amostras de carcinomas lobulares e ductais e identificar as proteínas diferencialmente expressas entre estes subtipos tumorais. Com este estudo pretende-se contribuir para o esclarecimento das vias biológicas responsáveis pela transformação e progressão neoplásica de cada subtipo histológico.

4.2 ESPECÍFICOS

- Estabelecer um protocolo adequado que possibilite a reprodutibilidade dos géis bidimensionais para o tecido mamário com carcinoma lobular;
- Confecção de mapas bidimensionais comparativos do proteoma representativo das pacientes com carcinomas lobulares e ductais;
- Identificar e determinar as proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas encontrada entre os dois grupos amostrais;
- Analisar, com o auxílio de bancos de dados públicos, a correlação dos achados protéicos que possam estar envolvidos na regulação da tumorigênese mamária, além de possíveis alvos moleculares em potencial para auxiliar no diagnóstico, prognóstico ou na predição de resposta às drogas de forma mais eficaz e específica.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Este trabalho faz parte de um grande projeto de pesquisa na área da Genética do Câncer de Mama, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG), Curitiba - PR. Processo nº 25000.007020/2003-93; registro no CONEP: 7220 e parecer nº 251/2003, de 20/02/2003. O grupo experimental foi composto de amostras de tecido tumoral de seis portadoras de carcinomas mamários lobulares e ductais, atendidas no HNSG e no Hospital das Clínicas (HC) de Curitiba, no período de 2007 a 2009. O estudo foi realizado no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética e no Departamento de Bioquímica, ambos da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

A média da idade das pacientes foi de $56,17 \pm 7,33$ anos, conforme o QUADRO 01, que apresenta também outras características dos tumores. Todas as informações foram obtidas diretamente dos laudos anátomo-patológicos.

| AMOSTRAS DE TECIDO TUMORAL | | | | | | | | |
|----------------------------|---------|---------------------------|------|---------|----------|----------|----------|----------------------|
| Cod. | Idade | Tipo Histológico | Grau | Tamanho | RE | RP | HER2 | Metástase Linfonodos |
| CP 585 | 66 anos | Carcinoma Lobular Invasor | II | 40 mm | Positivo | Negativo | Negativo | Sim |
| CP 596 | 50 anos | Carcinoma Lobular | I | 35 mm | Positivo | Positivo | Negativo | Sim |
| CP 638 | 48 anos | Carcinoma Lobular Invasor | II | 70 mm | Positivo | Positivo | Negativo | Sim |
| CP 630 | 52 anos | Carcinoma Ductal Invasor | I | 28 mm | Positivo | Positivo | Positivo | Sim |
| CP 641 | 58 anos | Carcinoma Ductal Invasor | II | 100 mm | Negativo | Negativo | Positivo | Sim |
| CP 645 | 63 anos | Carcinoma Ductal Invasor | II | 16 mm | Positivo | Positivo | Negativo | Sim |

QUADRO 01 – CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

FONTE: O autor (2011)

NOTA: **Cod** – código das amostras, **grau** – grau histológico dos tumores, **RE** – receptor de estrogênio, **RP** - receptor de progesterona, **HER2** – amplificação do oncogene *ERBB2/HER2*.

5.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

5.2.1 Coleta do Material Biológico e Armazenamento

Após a remoção cirúrgica e avaliação por um patologista confirmando a presença de células malignas, as amostras de tecido tumoral foram acondicionadas em tubos devidamente identificados e, em seguida, encaminhadas ao Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética da UFPR. No fluxo laminar, as amostras foram dispostas sobre uma Placa de Petri, à temperatura ambiente, para a remoção de tecidos adjacentes, vasos sangüíneos e gordura - posteriormente descartados. Os tumores foram fragmentados com o auxílio de pinças e tesouras estéreis e, em seguida, transferidos para microtubos de 1,5 mL e estocados a -80°C para posterior extração das proteínas.

5.2.2 Extração de Proteínas

Para obtenção do extrato e solubilização das proteínas, a lise das células foi realizada em tubos contendo 0,2g de amostra dissolvidas em 1 mL de Tampão de Lise (7mol/L uréia, 2 mol/L tiouréia, 40mmol/L DTT, 4% CHAPS e 0,2% inibidor de protease PMSF). O tecido foi desagregado e homogeneizado com homogeneizador elétrico; e depois as amostras foram sonicadas em 6 ciclos de 10 segundos, potência de 30% em sonicador (*Fisher Scientific*), intercaladas por 1 minuto em banho de gelo, para liberação total das proteínas. Após a centrifugação (12.000 rpm, 15 minutos, 4°C), o sobrenadante contendo as proteínas solubilizadas foi aliqotado (tubos 1,5 mL) e estocado a -80°C até o momento de uso. Durante todo o processo as amostras ficaram em banho de gelo para preservar a integridade do material.

5.3 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem de proteínas foi mensurada em triplicata pela técnica descrita por Bradford (1976), baseada na ligação do azul brilhante de Coomassie com a proteína e compara essa ligação com diferentes concentrações de uma proteína padrão, sendo utilizada a albumina de soro bovino (BSA). Esta interação estabiliza a

forma aniônica do corante, causando uma visível mudança de coloração inicialmente castanha para tons de azul, de acordo com a concentração protéica. A intensidade da cor azul resultante foi medida num leitor de microplacas no comprimento de onda de 595nm. A partir da relação entre os valores de concentrações e absorbância da curva padrão, a concentração das amostras pode ser determinada.

5.4 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

5.4.1 Isoeletrofocalização

A isoeletrofocalização (IEF) das proteínas foi realizada em tiras de 13 cm com gradiente de pH imobilizado (IPG), na faixa de pH 4 – 7 utilizando o equipamento *Ettan IPGphor II* (Amersham Bioscience).

Primeiramente as amostras protéicas (massa total - 1000µg) foram misturadas em tampão de reidratação contendo 7 mol/L de uréia, 2 mol/L de tiouréia e 2% de CHAPS, 0,5% de tampão IPG, 50mmol/l de DTT e traços de azul de bromofenol, para completar o volume total de 250µL.

A solução foi aplicada no suporte, onde as tiras IPG foram posicionadas com a face contendo o gel para baixo e em seguida, cobertas com 750µL de óleo mineral (*“Dry Strip Cover Fluid”*), a fim de evitar a cristalização da uréia. A reidratação seguiu a uma temperatura constante de 20°C durante 16 horas com 50V, realizada no próprio equipamento *Ettan IPGphor II*. Imediatamente após o término, a isoeletrofocalização ocorreu em 4 etapas: 500Vhr, 800Vhr, 11300Vhr e 13000Vhr, totalizando 26400Vhr. Após a IEF as tiras foram imediatamente armazenadas a - 80°C até a realização da segunda dimensão.

5.4.2 Equilíbrio das tiras IPG

Após a isoeletrofocalização, as tiras foram equilibradas para redução das pontes de dissulfeto, empregando-se 5mL de tampão de equilíbrio contendo 50mmol/L de Tris-HCl – pH 8,8; 6mol/L de uréia; 30% de glicerol e 2% de SDS e traços de azul de bromofenol, acrescido de 50mg de DTT, por 30 minutos, sob leve agitação em temperatura ambiente. Um segundo equilíbrio foi feito com o mesmo tampão de equilíbrio, substituindo o DTT por 200mg de iodoacetamida, sob as

mesmas condições, por mais 30 minutos, para alquilar grupos tiol e prevenindo a reoxidação durante a eletroforese. Após os dois passos de equilíbrio as tiras foram lavadas em tampão de corrida e imediatamente submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).

5.4.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS (SDS-PAGE)

A segunda dimensão foi realizada em um gel homogêneo de poliacrilamida 10% (m/v), de acordo com o método descrito por Laemmli (1970).

As tiras previamente equilibradas foram posicionadas horizontalmente sobre o gel SDS-PAGE 10% com dimensões de 18 cm x 16 cm. O gel bidimensional foi preparado com uma solução de Acrilamida/Bis-Acrilamida (36:1; m/m) em uma concentração de 30% (m/v), 1,5mol/L Tris-HCl pH 8.8, SDS 10% (m/v), persulfato de amônio 10% (m/v) e TEMED 0,04% (v/v). Adiciona-se em um papel filtro 8µL da solução estoque do marcador de massa molecular, o *Low Marker Weight* (GE Healthcare) (97, 66, 45, 30, 20,1 e 14,4 kDa). Uma vez devidamente posicionados, as tiras bem como os marcadores, foram selados com agarose 1% em tampão de corrida com traços de azul de bromofenol.

A eletroforese das proteínas em géis SDS-PAGE unidimensionais foi realizada utilizando uma cuba *Hoefler SE 600 Ruby* (GE Healthcare) sob temperatura de 11°C, mantida por refrigeração com circulador termostático *Multitemp II*, em um tampão de corrida Tris-HCl 25mmol/L, Glicina 190mmol/L e SDS 0,1% (m/v). Para que a passagem das proteínas da tira para o gel SDS-PAGE ocorresse de maneira suave e homogênea, a eletroforese foi desenvolvida a 15 mA/gel nos 45 minutos iniciais. O restante da corrida foi realizada a 30 mA/gel, sendo interrompida quando a linha de corrida, visualizada pelo corante azul de bromofenol, estivesse a 1cm do limite inferior do gel. A duração total foi cerca de 4 a 5 horas.

5.5 COLORAÇÃO, DIGITALIZAÇÃO E ANÁLISE COMPUTACIONAL

Os géis bidimensionais permaneceram durante pelo menos 2 horas, sob leve agitação, em solução contendo 1,3% (v/v) de ácido orto-fosfórico 85% e 20% (v/v) de metanol, para a fixação das proteínas no gel. Após esta etapa, os géis foram

corados utilizando a coloração Coomassie coloidal (WESTERMEIER e HAVEN, 2004), por um período de 16 a 20 horas, sob leve agitação, em solução contendo 1,5% de ácido orto-fosfórico 85%, 7,7% de sulfato de amônio e 0,01% de Coomassie G-250. Para permanecerem apenas as marcações dos *spots*, os géis foram descorados em água destilada. O armazenamento foi realizado a 4 °C em solução contendo 1% de ácido acético.

Os géis bidimensionais foram digitalizados utilizando o *ImageScanner™ II* (GE Healthcare) e analisados com o programa *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare). Os parâmetros para a detecção dos *spots* foram: *smooth* = 3 – que possibilita definir a resolução e discriminar ruídos dos *spots* sobrepostos, deve ser otimizado de forma a detectar *spots* reais; *saliency* = 25 – é uma medida baseada na curvatura do *spot*, que serve como um filtro para o algoritmo do programa selecionar os *spots* reais, os quais devem ser ajustados para que apresentem saliência maior que a do fundo; e *min area* = 5 – que é utilizado para eliminar artefatos próximos aos *spots*, como partículas do gel com *pixels* muito escuros. Após a detecção automática, segundo os parâmetros descritos acima os *spots* foram checados manualmente. As revisões foram feitas para adicionar *spots* não detectados, separar e unir *spots* e excluir artefatos da coloração detectados erroneamente. Para o pareamento entre os diferentes géis (*matching*), foram marcadas manualmente 5 *spots* correspondentes em todos os géis para possibilitar o pareamento automático pelo *software*. Para a determinação do ponto isoelétrico e massa molecular, foram plotados em coordenadas x e y nos géis bidimensionais, utilizando respectivamente a faixa de pH da tira e os marcadores com massa molecular conhecida entre 14,4 e 97 kDa (GE Healthcare).

Os géis representativos de cada tipo de tumor foram comparados para verificar a diferença de expressão. O parâmetro utilizado na análise estatística foi o volume relativo dos *spots*. Para a normalização do volume dos pontos protéicos detectados foi utilizado o modo de normalização de volume total de pontos protéicos, no qual o volume de cada ponto é dividido pelo volume total dos pontos detectados e multiplicado por 100. Tais dados foram analisados estatisticamente através do teste *t de Student*, considerando como *spots* diferencialmente expressos os que apresentassem uma variação estatística significativa ($p < 0,05$). Desta forma, foram

considerados com diferença quantitativa de expressão, os *spots* com aumento ou diminuição de pelo menos duas vezes o volume normalizado.

5.6 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

5.6.1 Preparo das Amostras

Os *spots* considerados diferencialmente expressos foram retirados manualmente do gel utilizando ponteiras novas estéreis tipo P1000 e colocadas em tubos tipo eppendorf (0,5 mL) contendo 200 µL de solução para descorar (50% de acetonitrila, 25mmol/L de bicarbonato de amônio) por uma hora. Este procedimento foi repetido quando necessário até a completa descoloração dos géis. Em seguida, foram submetidas a duas etapas de desidratação com 200 µL de acetonitrila 100% por 5 minutos cada. A acetonitrila foi descartada e os fragmentos de gel ficaram secando durante uma hora a 37°C.

Para a digestão proteolítica *in gel*, os *spots* selecionados foram reidratados em 10 µL de solução de tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin - Promega*) (15 ng/µL em tampão contendo 40mmol/L de bicarbonato de amônio e 10% de acetonitrila). A reidratação ocorreu durante 30 minutos em banho de gelo. Após esse período, a digestão foi realizada a 37° C por 16 a 20 horas. A solução contendo os peptídeos foi misturada na proporção 1:1 com solução de 50% de acetonitrila, 0,1% de ácido trifluoracético saturada com matriz HCCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinamínico). A partir do volume final de 2 µL, foi aplicado 1 µL da mistura na placa para MALDI (*scout MTP MALDI íon source 384 target - Bruker Daltonics*).

Quando necessário, foi realizada a concentração dos peptídeos, extraíndo os peptídeos trípticos do gel com 30 µl de solução de extração contendo 50% acetonitrila e 5% ácido trifluoracético (TFA), por 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente. O procedimento foi repetido duas vezes e as soluções sobrenadantes foram concentradas a vácuo e ressuspensas em 4 µl de TFA 0,1%.

5.6.2 Obtenção e Análise dos Espectros de Massa

As massas dos peptídeos trípticos foram determinadas utilizando um espectrômetro de massa MALDI-ToF/MS modelo *Autoflex II* (Bruker Daltonics) pertencente ao Departamento de Bioquímica, UFPR. O programa de computador utilizado é o *FlexControl 3.0* (Bruker Daltonics). Os espectros foram obtidos no modo refletor positivo, com uma voltagem de aceleração de 20 kV, intervalo de 150 nano segundos entre o pulso de *laser* e aplicação da voltagem, e faixa de aquisição entre 800 – 3200 Da. A calibração externa foi feita utilizando padrões de peptídeos de massa conhecida (ACTH 1-17, ACTH 1 - 24, ACTH 18-39, somatostatina, angiotensina I e angiotensina II) e como calibrador interno foram utilizados picos de autólise da tripsina (842,50 Da e 2211,10 Da) quando presentes. A análise e tratamento dos espectros foram realizados utilizando o programa *FlexAnalysis 3.0* (Bruker Daltonics).

Dados de fragmentação de peptídeos (espectro MS/MS) foram obtidos utilizando um Espectrômetro de massa MALDI-ToF/MS/MS tipo *Autoflex II* (Bruker Daltonics). O programa de computador utilizado foi o *FlexControl 3.0* (Bruker Daltonics). O espectro MS foi obtido utilizando os mesmos parâmetros descritos anteriormente e o espectro MS/MS foi obtido utilizando os parâmetros especificados pelo método LIFT do programa *FlexControl 3.0*.

5.6.3 Identificação das Proteínas por PMF (Peptide Mass Fingerprinting)

As proteínas foram identificadas a partir do padrão de massas obtido (PMF – *peptide mass fingerprinting*), utilizando o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>) associado ao uso do banco de dados *Swiss-Prot*. Os parâmetros de busca foram: enzima tripsina; um sítio de clivagem perdido; carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável (ANEXO 1). A tolerância de erro a ser utilizada foi de no máximo 100 ppm (partes por milhão). Picos de tripsina e queratina foram excluídos previamente à busca.

Os critérios considerados para a identificação incluem:

- Dados de pI e MM. valores teóricos (calculados) condizentes com os obtidos no gel (observados);
- MASCOT score de probabilidade. é o valor atribuído à identificação pelo programa de busca (ANEXO 2). O valor mínimo a partir do qual a identificação deixa de ser considerada aleatória é estipulado pelo programa e varia de acordo com a taxonomia da amostra. Em buscas por proteínas humanas, utilizando o banco de dados *Swiss-Prot* e o programa MASCOT, esse valor é 56. Quanto maior o *score*, maior a confiabilidade na identificação;
- Percentual da cobertura de sequência. Este valor indica o quanto da sequência de aminoácidos da proteína sugerida foi coberto pelos peptídeos resultantes da digestão trípica da amostra (ANEXO 3). Valores acima de 20% foram considerados satisfatórios;
- Número de peptídeos sobrepostos. Corresponde ao número de picos de massa obtidos por MS que foram pareados com as massas teóricas provenientes de clivagem *in silico*. Os valores teóricos são fornecidos pelo programa de busca MASCOT (ANEXO 3). Foi aceito o mínimo de 4 peptídeos sobrepostos.

Para considerar como positiva a identificação, a proteína atendeu pelo menos dois dos critérios acima mencionados.

5.6.4 Identificação por Espectrometria de massa em *tandem* – MS/MS

Os espectros MS/MS foram confrontados com o banco de dados *Swiss-Prot*, utilizando o programa Mascot (<http://www.matrixscience.com/>). As buscas foram realizadas restritamente para proteínas de *Homo sapiens*, considerando a digestão com tripsina e perda de uma clivagem. A tolerância foi de 0,60 Da para massa dos íons-fragmento e de até no máximo 100 ppm para os precursores. Oxidação de metionina e carbamidometilação de cisteínas foram especificadas como modificações variáveis e constantes, respectivamente. Os resultados foram gerados para $p < 0,05$. Peptídeos identificados com *ion score* individual inferior a 20 foram descartados (ANEXOS 04, 05 e 06).

5.6.5 Análise funcional das proteínas

A análise funcional de proteínas expressas no tecido mamário tumoral foi realizada utilizando ferramentas de bioinformática como o NCBI – *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e com a classificação “Gene ontology” (<http://www.Ensembl.org/index.html/>). Os nomes e siglas utilizados para as proteínas foram os indicados no banco de dados *UniProtKB/Swiss-Prot* (<http://www.uniprot.org/>). Os respectivos genes são representados pelas siglas e nomes oficiais de acordo com o *Ensembl* (<http://www.Ensembl.org/index.html/>).

Os nomes e siglas das proteínas indicados pelo banco de dados e a tolerância (ppm) utilizada na identificação de cada um dos *spots* estão representados no APÊNDICE 2.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO

A primeira etapa deste trabalho baseou-se em estabelecer um conjunto de condições que possibilitassem boa resolução e reprodutibilidade dos géis bidimensionais para o tecido de mama com Carcinoma Lobular, que apresentou um comportamento bastante diverso do Carcinoma Ductal. Portanto, a técnica que estava implantada no laboratório (mantida para os carcinomas ductais) precisou ser otimizada de acordo com as características da amostra em estudo. Foi necessário realizar diferentes métodos para o preparo da amostra, concentrações de proteína e protocolos de isoeletrofocalização.

6.2 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO PROTÉICA DO CARCINOMA LOBULAR

A boa preparação da amostra – “extração do máximo número possível de proteínas de uma determinada célula, tecido, órgão ou organismo” (WILKINS *et al.*, 1996) – é um procedimento muito importante para garantir a subsequente separação, resolução e identificação das proteínas. A preparação das amostras de tecido mamário lobular não foi uma tarefa fácil devido às dificuldades de obtenção dos extratos protéicos que serão descritos a seguir.

Inicialmente, para a extração protéica do tecido tumoral seguia-se o protocolo que utilizava tampão de lise (7M Uréia, 2M Tiuréia, 4% CHAPS, 40mmol/L Tris e 0,2% inibidor de protease PSMF) e para desagregação do tecido e homogeneização era utilizado o homogeneizador elétrico. As condições da isoeletrofocalização utilizadas eram da seguinte forma: reidratação à temperatura ambiente por 16 horas, e voltagem acumulada de 17.500 kVh na focalização isoeletrica. Um gel bidimensional resultante deste protocolo é apresentado na FIGURA 06A. Como representa a figura, este protocolo não reproduziu um perfil proteômico da amostra em estudo. Desta forma, optou-se por testar condições que

permitissem uma maior resolução dos *spots* e conseqüentemente um melhor perfil bidimensional.

Para a extração protéica das amostras, foi preciso estabelecer um protocolo que conseguisse solubilizar as proteínas, já que as dificuldades iniciais foram o aspecto fibroso, a rigidez do tecido no momento da lise e a formação de espuma devido a presença de surfactante (CHAPS) no tampão de lise, resultando num pequeno volume de extrato, além do aspecto difuso e colóide das amostras. Outro problema foi em relação à focalização, onde a amostra não alcançava a voltagem determinada, ou seja, as proteínas não estavam sendo separadas pelo seu ponto isoelétrico (pI). A evidência de que as tiras IPG não estavam focalizando, era visualizada pelo acúmulo de amostra nas extremidades da tiras, e também pelo corante de bromofenol que não migrava para o ânodo e não desaparecia no final da corrida. Além disso, o gel bidimensional apresentava zonas em que as proteínas não focalizavam, representadas por faixas (*streaks*) horizontais como apresenta a FIGURA 06A. Os principais fatores que interferem na eletroforese bidimensional são a presença de sais, ácidos nucleicos, detergentes iônicos, lipídios, polissacarídeos e fenóis, os quais dificultam a visualização dos *spots* e interferem na dosagem protéica (JIANG; HEA; FOUNTOULAKIS, 2004).

Primeiramente, realizou-se um teste para avaliar se a precipitação com ácido tricloroacético (TCA) e acetona da amostra já extraída, iria eliminar ou reduzir a quantidade destes contaminantes presentes na amostra. Tais componentes iônicos, como os sais, aumentam a condutividade e seu excesso pode provocar *streaks* nos géis 2D, devido a distúrbios na isoeletrofocalização (concentração ideal de sais inferior a 10mmol/L) (GE Healthcare, 2004), optou-se por retirar o Tris do tampão de lise que estava a 40mmol/L. Os resultados deste protocolo permitiram a visualização dos *spots* e também diminuiu a presença dos interferentes. No entanto, durante a precipitação com TCA, ocorreu à diminuição geral da quantidade de proteínas, que foi mensurado pelo teste de Bradford e também se notou diferenças sutis no padrão do gel (QUADRO 02, FIGURA 6B). Por isso, concluiu-se que este método não era adequado para a análise proteômica proposta, pois excluía uma parte significativa de proteínas presentes no carcinoma lobular.

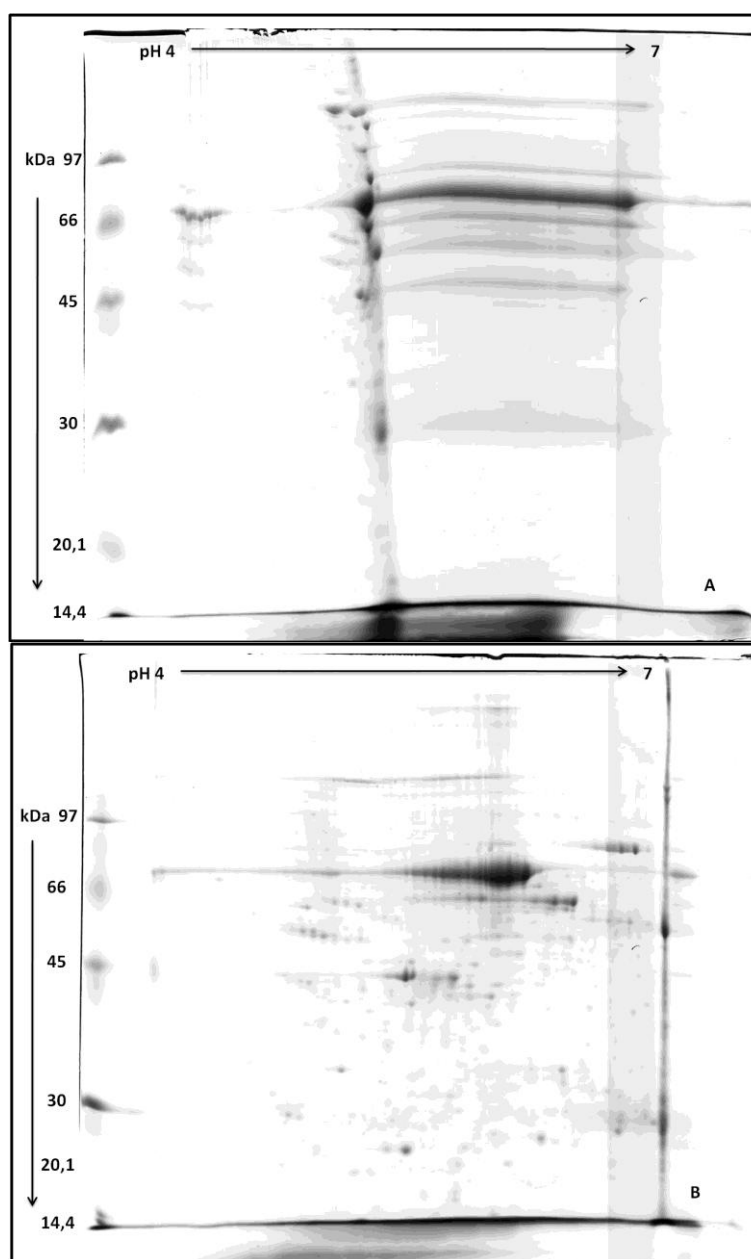


FIGURA 06 – GÉIS BIDIMENSIONAIS DA AMOSTRA CP 638.

FONTE - O autor (2011)

LEGENDA - **Gel A** – Extração protéica feita com homogeneizador mecânico, utilizando 1mg de proteína. **B** – Extrato protéico da mesma amostra com precipitação em TCA e lavados com acetona, utilizando 300 µg de proteína.

Outra dificuldade encontrada na preparação da amostra refere-se ao aspecto viscoso do extrato, o qual dificultava a manipulação. Acrescentando a técnica de sonicação ao protocolo resolvemos esta variável, tornando o aspecto mais solúvel e translúcido. A sonicação auxilia na solubilização das proteínas, no rompimento de membranas, na fragmentação dos ácidos nucleicos e também remove os interferentes causados pelos polissacarídeos. Tais interferentes, além de

aumentarem a viscosidade da solução, podem interagir com os anfólitos, utilizados na isoeletrofocalização, e com proteínas obstruindo o gel de poliacrilamida (GE Healthcare, 2004).

| Amostra | Protocolo | [†] Massa (g) | Concentração (µg/µL) |
|---------|-------------------------|------------------------|----------------------|
| CP638 | Homogeneização Mecânica | 0,4 | 11,4 |
| CP638 | *Precipitação | 0,4 | 4,63 |
| CP638 | *Sonicação | 0,2 | 8,22 |

QUADRO 02 – DOSAGEM DE PROTEÍNAS EM CADA CONDIÇÃO

FONTE - o autor (2011)

NOTA - [†]Massa de tecido utilizada para a extração de proteínas. *Foi acrescentado ao protocolo que estava sendo aplicado no laboratório.

É importante ressaltar que os protocolos testados foram realizados na mesma amostra de tecido tumoral. Pelas imagens, observa-se a qualidade da separação de proteínas usando a técnica de sonicação e a retirada do sal presente no tampão de lise (FIGURA 07), demonstrando ser superior aos das amostras preparadas por precipitação com TCA/acetona. Conclui-se que o protocolo adotado para a preparação da amostra diminui satisfatoriamente a presença de *streaks* horizontais, melhorou a resolução e aumentou o número dos *spots* em comparação com a amostra tratada pelos outros protocolos.

Tanto o protocolo para extração de proteínas quanto a isoeletrofocalização foram otimizados com êxito, apresentando resultados satisfatórios. Os valores das concentrações protéicas de cada amostra e a quantidade de material utilizada para a obtenção dos extratos estão descritos no QUADRO 03.

| Amostras | Tipos histológicos | [†] Massa (g) | Concentração (µg/µL) |
|----------|---------------------------|------------------------|----------------------|
| CP 638 | Carcinoma Lobular Invasor | 0,2 | 8,22 |
| CP 585 | Carcinoma Lobular Invasor | *0,187 | 9,07 |
| CP 596 | Carcinoma Lobular | 0,2 | 7,39 |
| CP 645 | Carcinoma Ductal Invasor | 0,2 | 10,93 |
| CP 641 | Carcinoma Ductal Invasor | *0,193 | 10,47 |
| CP 630 | Carcinoma Ductal Invasor | 0,2 | 10,61 |

QUADRO 03 – DOSAGEM PROTÉICA

FONTE - o autor (2011)

NOTA - [†]Massa de tecido utilizada para a extração de proteínas. *Todo o material das amostras CP585 e CP641 foi utilizado.

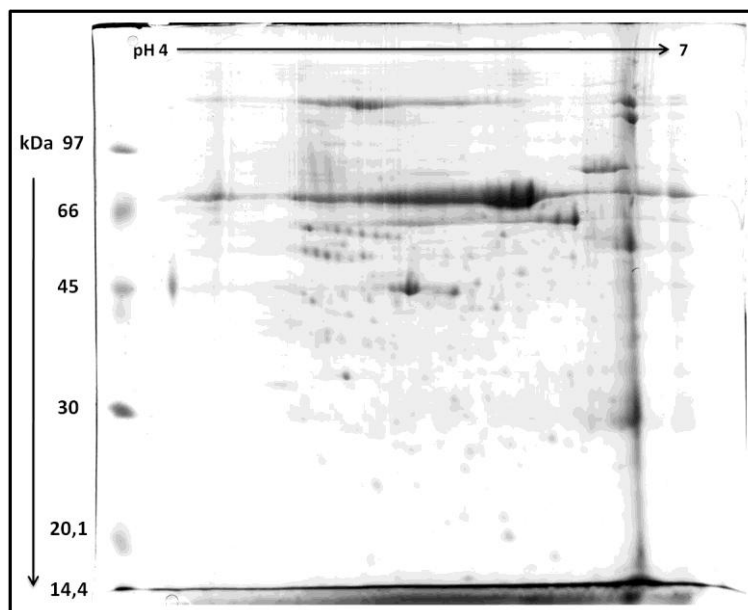


FIGURA 07 – GEL BIDIMENSIONAL DA AMOSTRA CP 638

FONTE - O autor (2011)

LEGENDA - Extração de proteínas foi realizada com homogeneizador elétrico e sonicador, sem presença de sal no tampão lise e adequação da isoeletrofocalização para o tecido lobular de mama. Evidência da redução das *streaks* horizontais. A primeira dimensão foi realizada em tira IPG pH 4 a 7 e a segunda dimensão em gel de poliacrilamida 10%, corado com coomassie coloidal.

6.3 QUANTIDADE DE PROTEÍNA

Gorg e colaboradores (2000) sugerem que 1 mg de proteína pode ser aplicado obtendo sucesso em tiras IPG pH 4 – 7, apesar de outros trabalhos observarem a redução da resolução dos géis em alta massa protéica (HESKETH *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 2003). Apesar de que neste trabalho foi aplicado 1 mg de proteína, isso não reduziu a resolução do gel e não teve o aparecimento das *streaks*, além de aumentar o número de *spots* detectados na faixa de pH 4-7.

Mas para isso foi necessário adequar as condições da isoeletrofocalização, em razão dessa alta massa protéica aplicada no gel. Para facilitar a entrada das proteínas de alto peso molecular ($M > 100$ kDa), aplicou-se reidratação ativa a uma voltagem baixa de 50V por 16 horas, protocolo também recomendado para amostras com alta concentração de sal (GORG *et al.*, 2004). Para garantir a separação das proteínas submeteu-se as amostras a uma alta voltagem, totalizando 26400Vhr, e o tempo de isoeletrofocalização variou de 6 a 8 horas dependendo da amostra.

O perfil de expressão protéica foi também analisado em géis bidimensionais na concentração de 500 μ g. Foram detectados visualmente os mesmos *spots*, porém mais fracos, os quais foram evidenciados na maior concentração. Os dados

desta condição não serão descritos, por terem resultados similares aos descritos anteriormente.

Foram obtidos géis bidimensionais apresentando uma boa resolução e foi eliminada a presença de *streaks* horizontais, portanto a adequação do protocolo permitiu o perfil da expressão protéica do carcinoma lobular.

6.4 ANÁLISE DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS

A FIGURA 08 apresenta os três géis bidimensionais representativos obtidos para o tecido mamário de pacientes com carcinoma lobular e a FIGURA 09 com carcinoma ductal. Cada tipo de tumor contém uma triplicata biológica, e para cada amostra foram confeccionados três géis bidimensionais, totalizando dezoito géis. Essas repetições foram necessárias para analisar a condição fisiológica relativa a cada tipo de tumor. O número de *spots* detectados foram analisados pelo programa *ImageMastertm 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare) apresentado no QUADRO 04.

| CP 585 | | CP 596 | | CP 630 | |
|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| Gel | nº de spots | Gel | nº de spots | Gel | nº de spots |
| T1 | 604 | T1 (Ref.) | 800 | T1 | 652 |
| T2 (Ref.) | 501 | T2 | 418 | T2 (Ref.) | 490 |
| T3 | 478 | T3 | 428 | T3 | 307 |
| CP 638 | | CP 641 | | CP 645 | |
| Gel | nº de spots | Gel | nº de spots | Gel | nº de spots |
| T1 (Ref.) | 490 | T1 | 498 | T1 | 627 |
| T2 | 428 | T2 | 492 | T2 (Ref.) | 622 |
| T3 | 612 | T3 (Ref.) | 883 | T3 | 695 |

QUADRO 04 – NÚMERO DE SPOTS DETECTADOS NOS GÉIS BIDIMENSIONAIS

FONTE: o autor (2011)

NOTA: **T1**, **T2**, **T3** – géis em triplicatas de cada amostra; **Ref.** – gel de referência. Para cada amostra os géis de referência estão indicados entre parênteses.

Após a detecção dos *spots* e análise individual de cada gel, foi determinado um gel de referência para cada amostra. Este foi selecionado como sendo o gel que melhor caracterizou a amostra, baseado na representatividade e resolução dos *spots*, ou seja, apresentam o maior número possível de *spots* e que devem também estar bem definidos no gel. A semelhança do perfil protéico, ou seja, uma boa reprodutibilidade dos géis é importante para a análise comparativa dos géis bidimensionais, principalmente entre grupos tumorais diferentes, possibilitando a

visualização dos perfis protéicos e facilitando o pareamento entre os géis pelo programa de análise.

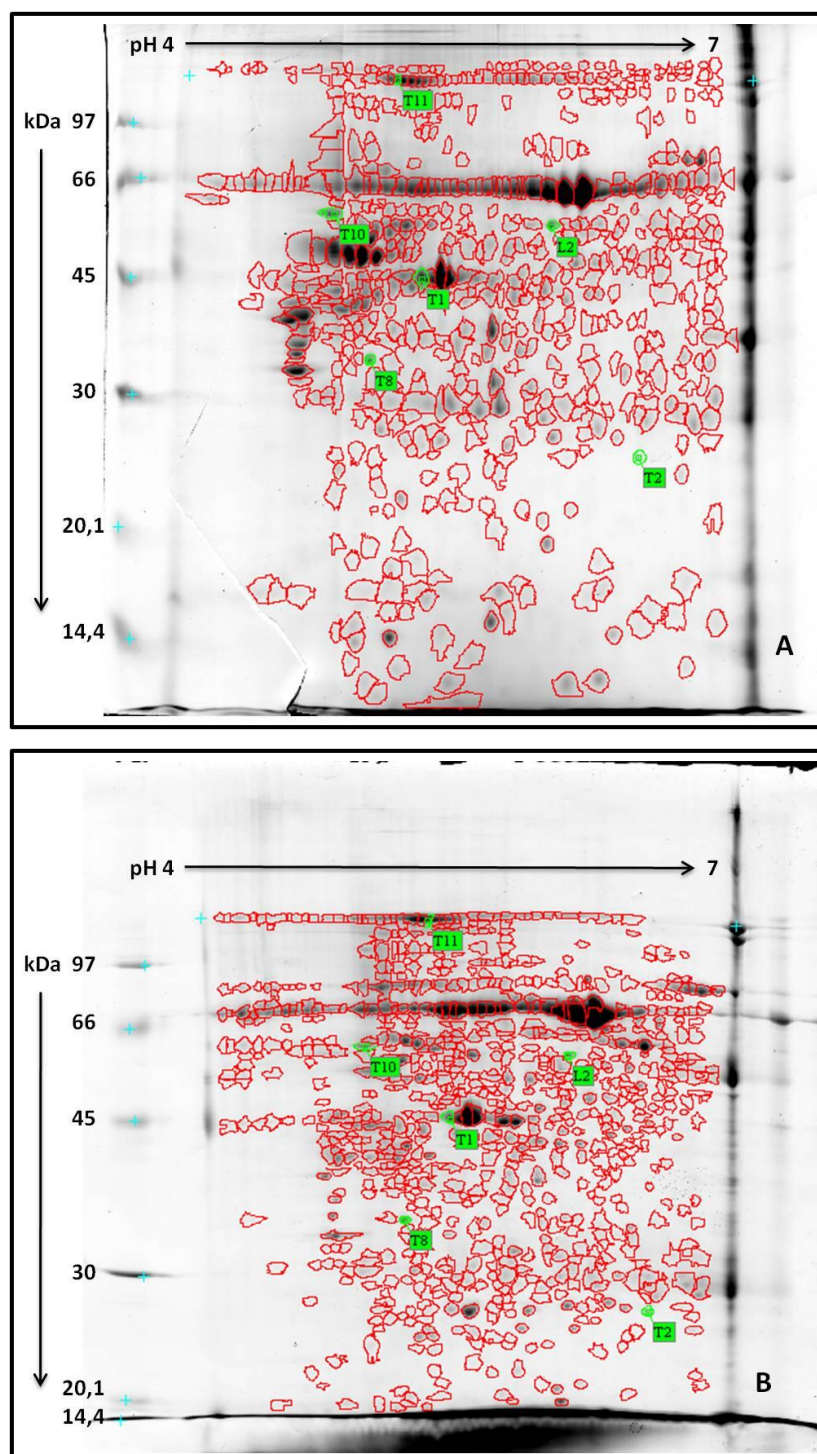


FIGURA 08 - GÉIS DE REFERÊNCIA DO CARCINOMA LOBULAR (continua)

FONTE: O autor (2011)

LEGENDA: Gel CP585 T2 (A) e CP596 T1 (MASTER) (B). Spots detectados pelo programa *ImageMaster* destacados em vermelho. T1, T2, L2, T8, T10 e T11, destacados pelo quadrado verde, representam os spots utilizados para pareamento entre o gel *Master* (B) e os demais.

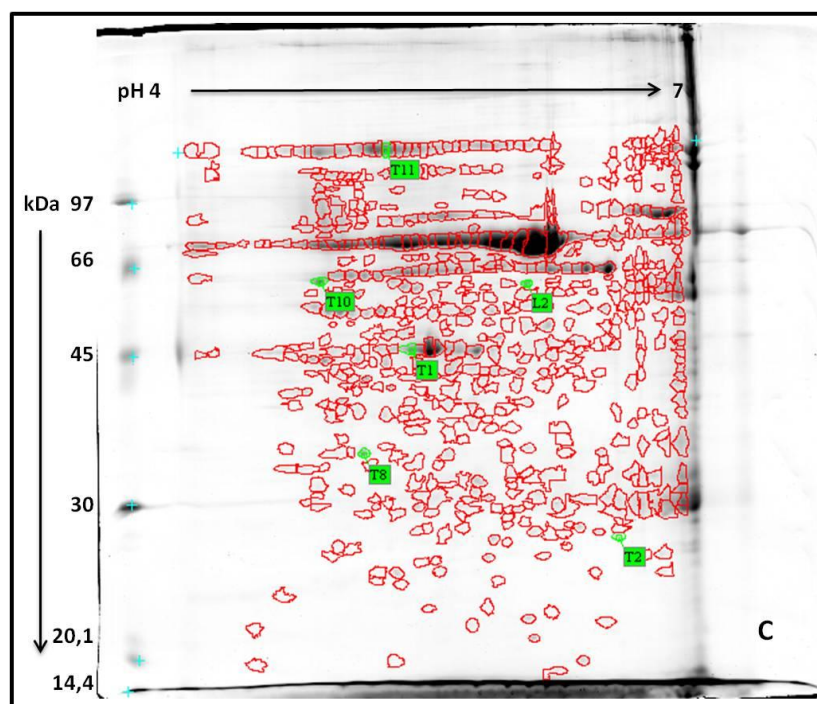


FIGURA 08 - GÉIS DE REFERÊNCIA DO CARCINOMA LOBULAR (conclusão)

FONTE: O autor (2011)

LEGENDA: Gel CP638 T1 (C). Spots detectados pelo programa *ImageMaster* destacadas em vermelho. T1, T2, L2, T8, T10 e T11, destacadas pelo quadrado verde, representam os spots utilizados para pareamento entre o gel Master (B) e os demais

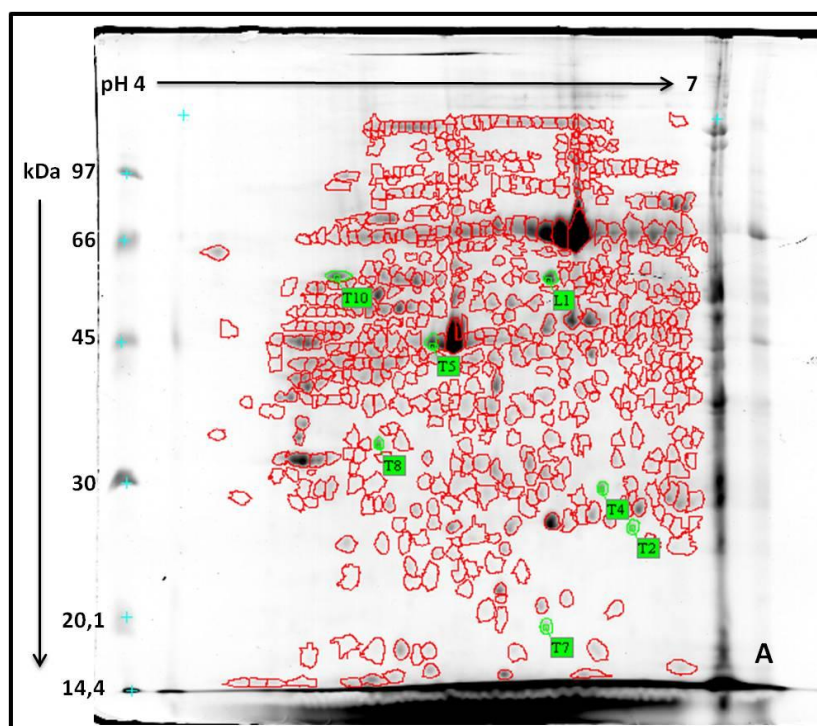


FIGURA 09 - GÉIS DE REFERÊNCIA DO CARCINOMA DUCTAL INVASOR (continua)

FONTE: O autor (2011)

LEGENDA: Gel CP630 T2 (A). Spots detectados pelo programa *ImageMaster* destacados em vermelho. L1, T2, T4, T5, T7, T8 e T10, destacadas em verde, representam os spots utilizados para pareamento entre o gel Master (C) e os demais.

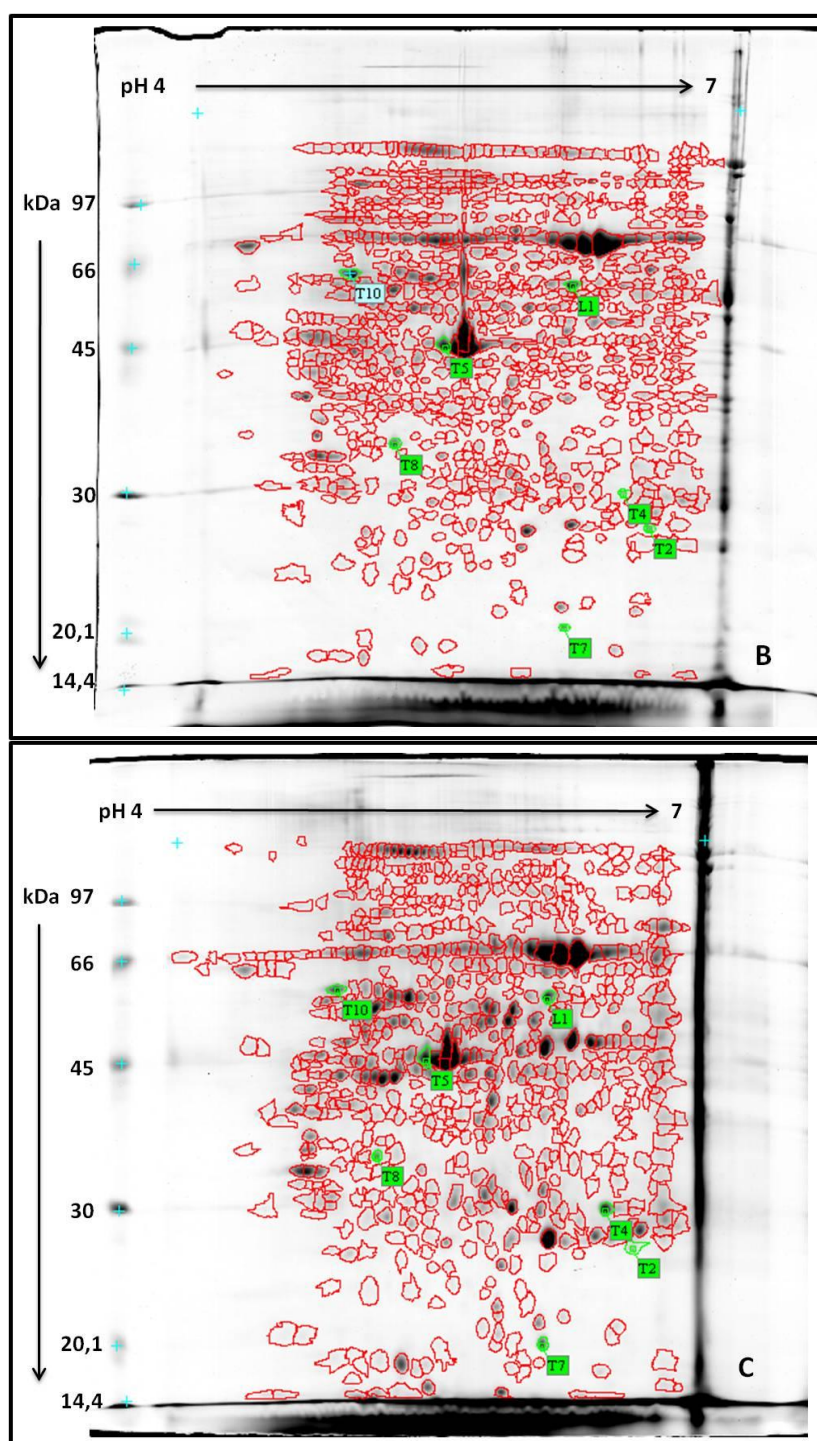


FIGURA 09 - GÉIS DE REFERÊNCIA DO CARCINOMA DUCTAL INVASOR (conclusão)

FONTE: O autor (2011)

LEGENDA: Gel CP641 T3 (B) e CP645 T2 (MASTER) (C). Spots detectados pelo programa *ImageMaster* destacados em vermelho. L1, T2, T4, T5, T7, T8 e T10, destacados em verde, representam os spots utilizados para pareamento entre o gel *Master* (C) e os demais.

Depois de selecionado os três géis de referência para cada grupo de tumor, foram submetidos à análise comparativa entre cada grupo. Os géis CP596 T1 e CP645 T2 foram escolhidos como géis de referência (*Master*), para as amostras de carcinoma lobular e ductal, respectivamente, servindo como base para a

comparação e determinação de pl e MM dos *spots* no programa *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare). Desta análise, observou-se que 800 e 622 *spots* detectados estavam presentes no gel CP596 T1 e CP645 T2, respectivamente. Os géis de referência de cada tipo de tumor foram pareados automaticamente pelo *software* de análise, e então foi verificada a diferença de expressão protéica.

6.5 ANÁLISE COMPARATIVA DO TECIDO MAMÁRIO DE PACIENTES COM CARCINOMA DUCTAL E LOBULAR

Quando comparados os perfis bidimensionais do tecido mamário de pacientes com carcinoma lobular e ductal foram observadas diferenças no padrão de expressão das proteínas. No entanto, poucas alterações foram observadas quanto à presença ou ausência de *spots* nos géis comparados. Com as análises feitas no *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare), foi possível comparar os géis e realizar análises estatísticas dos *spots* diferencialmente expressos, utilizando-se determinados recursos dos *softwares* como a normalização da intensidade dos géis e a criação de um gel sintético para cada tipo de tumor.

A detecção automática dos *spots* realizada pelo programa é extremamente sensível, considerando toda e qualquer alteração na intensidade do gel como *spot*. Por esse motivo foi realizada correção manual, adição e remoção dos *spots*, sempre mantendo uma intervenção humana mínima durante a análise. Os géis de referência do grupo de amostras do carcinoma lobular apresentaram uma média de número de *spots* igual a 528, e os das amostras do carcinoma ductal apresentaram média de 585. Porém, este é um número aproximado de *spots* presentes, porque os géis diferem quanto à resolução e o número de *spots* presentes em cada gel de referência. Contudo, se considerarmos estes dados, observa-se que ocorreu apenas uma pequena alteração do número de *spots* totais entre as duas condições analisadas, levando em consideração todas as triplicatas confeccionadas.

Na FIGURA 10, estão representados os perfis dos géis bidimensionais representativos, ou seja, o gel de referência obtido para o carcinoma lobular (596T1 - A) e para o carcinoma ductal (645T2 - B), na faixa de pH 4 – 7.

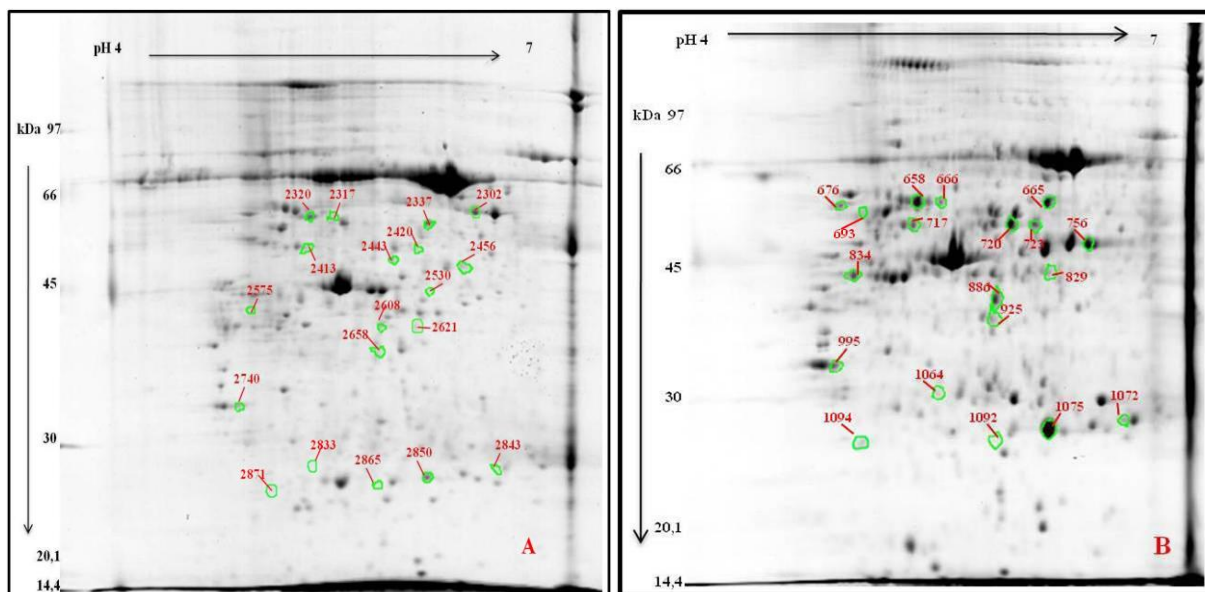


FIGURA 10 - MAPAS PROTEÔMICOS BIDIMENSIONAIS

FONTE - O autor (2011)

LEGENDA - A – Proteínas expressas no Carcinoma Lobular (596T1) e B – Proteínas expressas no Carcinoma Ductal (645T2). Os números representam o *SPOT* ID das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos, que foram submetidos à espectrometria de massa.

Através das análises qualitativas e quantitativas foi possível detectar quais *spots* presentes e ausentes com seus níveis de intensidade aumentados pelo menos 2 vezes em relação ao *spot* correspondente entre os diferentes tipos tumorais, lobular e ductal, dados apresentados no APÊNDICE 1. A análise comparativa entre o gel de referência do carcinoma ductal, este como base, versus o gel de referência do carcinoma lobular demonstraram 18 *spots* estatisticamente relevantes, apresentando níveis de expressão aumentada no carcinoma ductal, com intensidade relativa variando de 2,07 a 5,06 vezes. Quanto à presença ou ausência, três *spots* estavam presentes somente na amostra de carcinoma ductal sendo também submetidos à análise por espectrometria de massas.

De forma inversa, a análise comparativa realizada entre os géis de referência dos carcinomas lobulares e ductais, utilizando o primeiro como base comparativa, apresentou poucas diferenças significativas, quanto ao aumento de expressão dos *spots* no carcinoma lobular. Como exceção, o *spot* 2621 apresentou significância estatística, e estava presente apenas no carcinoma lobular, porém não foi possível identificá-lo, em razão da baixa quantidade de peptídeos presente na amostra. Além deste, o *spot* 2302 também foi submetido à análise por espectrometria de massas, apesar de apresentar uma variação estatística de $p < 0,1$, demonstrou uma diferença de 6,51 vezes no nível de expressão aumentada no

carcinoma lobular, motivo pelo qual foi selecionado para subsequente análise. O mesmo padrão de seleção foi estipulado para os *spots* 676 e 1075, com expressão aumentada, no entanto, no carcinoma ductal. Apesar de seguir o protocolo de concentração de peptídeos, muitos deles acabaram sendo perdidos durante a extração, sendo que tal variável é inerente à técnica utilizada.

Na pesquisa de proteínas diferencialmente expressas, foram analisados 18 *spots* nas amostras de carcinomas ductais e os correspondentes nas amostras de carcinomas lobulares, totalizando 36 *spots*. Essa abordagem foi necessária para validar a informação de que ambos os *spots* correspondiam à mesma proteína, expressa em cada tumor. Além destes, foram submetidos à análise mais dois *spots* expressos somente no carcinoma lobular e outros três expressos somente no carcinoma ductal (*spots* ID: 2621, 2302, 676, 693 e 1075). Do total, 30 *spots* tiveram identificação positiva, correspondendo a 26 proteínas diferentes.

A TABELA 02 lista as proteínas diferencialmente expressas nas pacientes com carcinoma ductal e a TABELA 03 nas pacientes com carcinoma lobular identificadas por PMF, juntamente com o número do respectivo *spot*, valores de massa molecular, pI, *score* e outros dados. A TABELA 04 lista as proteínas diferencialmente expressas nas duas condições identificadas por MS/MS.

A TABELA 05 apresenta as proteínas diferenciais identificadas subdivididas de acordo com a função biológica e descreve suas principais funções no processo biológico e molecular, e localização. Para tal utilizamos como base a classificação do “Gene Ontology” e o estudo de Pucci-minafra *et al.* (2006), que elaboraram um catálogo de proteínas a partir do mapa de referência de uma linhagem celular neoplásica de tecido mamário. Apesar de terem sido classificadas em determinada função, estas podem também apresentar outras funções biológicas.

A análise correspondente realizada nas amostras de carcinomas ductais confirmou a expressão aumentada na maioria, com exceção dos *spots* 925, 829, 720 e 723, que apresentaram identificação protéica diversa aos correspondentes (2658, 2530, 2443 e 2420, respectivamente no carcinoma lobular).

A maioria das proteínas identificadas foram encontradas na posição esperada, baseada na comparação entre os valores teóricos de massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pI) de cada *spot* e os valores observados nos géis bidimensionais. Parâmetros utilizados no trabalho de Dupont *et al.* (2005),

permitiram esse resultado seguindo os padrões propostos de $\Delta MM < 20\%$ e $\Delta pI < 0,6$. Os parâmetros para cada *spot* estão representados no APÊNDICE 2. Esta análise demonstrou que 8 e 4 *spots* diferiram da localização esperada com relação à massa molecular e valor de pI, respectivamente. Cada proteína que apresentou essa variação será discutida posteriormente.

Em alguns casos, a mesma proteína foi identificada em diferentes *spots*, em localizações distintas no gel de referência. Isso ocorre devido a modificações pós-traducionais, que podem alterar o ponto isoelétrico e massa molecular das proteínas. As diferenças entre massas moleculares e/ ou pontos isoelétricos observados e teóricos entre estes *spots* se devem à presença de diferentes isoformas da mesma proteína. Das 26 proteínas identificadas 23% foram representadas por diversos *spots*.

TABELA 02 - PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS IDENTIFICADAS POR PMF EM PACIENTES COM CARCINOMA DUCTAL

| Nome da proteína (Sigla) | Spot ID | Gene | Região Crom. | Código UniprotKB | Nível diferencial do Spot | MASCOT Score (>56) | Tolerância (ppm) | MM (kDa) / pI Teórico | MM (kDa) / pI Observado | Cobertura de sequência (%) | Nº de peptídeos sobrepostos |
|--|---------|--------|--------------|------------------|---------------------------|--------------------|------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Actina Citoplasmática 1 (ACTB) | 886 | ACTB | 7p22.1 | Q96HG5 | 5,06 | 70 | 100 | 42,0/ 5,29 | 40,0/ 5,81 | 23% | 6/17 |
| Actina Citoplasmática 2 (ACTG) | 886 | ACTG1 | 17q25.3 | P63261 | 5,06 | 70 | 100 | 42,1/ 5,31 | 40,0/ 5,81 | 23% | 6/17 |
| Albumina (ALBU) | 756 | ALB | 4q13.3 | Q9P157 | 2,47 | 199 | 100 | 71,3/ 5,92 | 49,0/ 6,37 | 27% | 13/13 |
| | 720 | ALB | 4q13.3 | Q9P157 | 4,17 | 212 | 40 | 71,3/ 5,92 | 53,0/ 5,90 | 33% | 17/24 |
| | 1075 | ALB | 4q13.3 | Q9P157 | 2,29 | 236 | 40 | 71,3/ 5,92 | 26,0/ 6,06 | 24% | 17/30 |
| F-actina-capping proteína de subunidade alfa-1 (CAZA1) | 925 | CAPZA1 | 1p13.2 | P52907 | 2,26 | 60 | 100 | 33,0/ 5,45 | 38,0/ 5,79 | 29% | 5/18 |
| Proteína dissulfeto-isomerase A3 (PDIA3) | 665 | PDIA3 | 15q15.3 | P30101 | 2,75 | 117 | 100 | 57,1/ 5,98 | 57,0/ 6,12 | 25% | 13/30 |
| Proteína Heme-binding (HEBP1) | 1092 | HEBP1 | 12p13.1 | Q9NRV9 | 2,55 | 72 | 40 | 21,1/ 5,71 | 27,0/ 5,72 | 29% | 5/10 |
| Proteína de ligação da Vitamina D (VTDB) | 666 | GC | 4q13.3 | P02774 | 2,68 | 60 | 50 | 54,5/ 5,40 | 56,0/ 5,45 | 12% | 5/13 |
| Triose-fosfato isomerase (TPIS) | 1072 | TPI1 | 12p.13.31 | P60174 | 2,44 | 174 | 40 | 26,9/ 6,45 | 28,0/ 6,58 | 60% | 12/26 |
| Tropomiosina cadeia alfa-3 (TPM3) | 995 | TPM3 | 1q21.3 | P06753 | 2,07 | 83 | 100 | 32,8/ 4,68 | 33,0/ 4,84 | 17% | 7/11 |
| Tubulina cadeia alfa-1C (TBA1C) | 886 | TUBA1C | 12q13.12 | Q9BQE3 | 5,06 | 67 | 100 | 50,5/ 4,96 | 40,0/ 5,81 | 19% | 6/17 |
| | 658 | TUBA1C | 12q13.12 | Q9BQE3 | 2,26 | 98 | 100 | 50,5/ 4,96 | 57,0/ 5,34 | 26% | 8/23 |
| Tubulina cadeia alfa-1A (TBA1A) | 886 | TUBA1A | 12q13.12 | Q71U36 | 5,06 | 67 | 100 | 50,7/ 4,94 | 40,0/ 5,81 | 19% | 6/17 |
| | 658 | TUBA1A | 12q13.12 | Q71U36 | 2,26 | 116 | 100 | 50,7/ 4,94 | 57,0/ 5,34 | 30% | 9/23 |
| Tubulina cadeia alfa-1B (TBA1B) | 886 | TUBA1B | 12q13.12 | P68363 | 5,06 | 67 | 100 | 50,8/ 4,94 | 40,0/ 5,81 | 19% | 6/17 |
| | 658 | TUBA1B | 12q13.12 | P68363 | 2,26 | 135 | 100 | 50,8/ 4,94 | 57,0/ 5,34 | 33% | 10/23 |
| Tubulina cadeia alfa-4A (TBA4A) | 658 | TUBA4A | 2q35 | P68366 | 2,26 | 98 | 100 | 50,6/ 4,95 | 57,0/ 5,34 | 25% | 8/23 |
| Tubulina cadeia alfa-3C/D (TBA3C) | 658 | TUBA3C | 13q12.11 | Q13748 | 2,26 | 82 | 100 | 50,6/ 4,97 | 57,0/ 5,34 | 24% | 7/23 |
| Tubulina cadeia alfa-8 (TBA8) | 658 | TUBA8 | 22q11.21 | Q9NY65 | 2,26 | 66 | 100 | 50,7/ 4,98 | 57,0/ 5,34 | 20% | 6/23 |
| Tubulina cadeia alfa-3E (TBA3E) | 658 | TUBA3E | 2q21.1 | Q6PEY2 | 2,26 | 66 | 100 | 50,5/ 5,00 | 57,0/ 5,34 | 20% | 6/23 |
| Vimentina (VIME) | 834 | VIM | 10p13 | P08670 | 4,69 | 188 | 100 | 53,6/ 5,06 | 43,0/ 4,96 | 33% | 15/19 |

FONTE: autor (2011)

NOTA: **Spot ID** - identificação do *spot* no gel; **MASCOT Score** – parâmetro do software Mascot que representa confiança de $p < 0,05$ na identificação da proteína; **Massa molecular (MM) e pI Teórico** valores obtidos do banco de dados; **Massa molecular (MM) e pI Observado** – valores obtidos através da análise de imagem. **Cobertura**: porcentagem da sequência da proteína que foi identificada. **Número de peptídeos sobrepostos**: corresponde aos picos de massa obtidos com a MS e que foram pareados com as massas teóricas, provenientes da clivagem *in silico*. **Nível diferencial do Spot** – diferença no nível de expressão das proteínas em relação ao carcinoma lobular.

TABELA 03 - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR PMF EM PACIENTES COM CARCINOMA LOBULAR

| Nome da proteína (Sigla) | Spot ID | Gene | Região Crom. | Código UniprotKB | Nível diferencial do Spot | MASCOT Score (>56) | Tolerância (ppm) | MM (kDa) / pl Teórico | MM (kDa) / pl Observado | Cobertura de seqüência (%) | Nº de peptídeos sobrepostos |
|--|---------|----------|--------------|------------------|---------------------------|---------------------|------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Actina Citoplasmática 1 (ACTB) | 2608 | ACTB | 7p22.1 | Q96HG5 | -5,06 | 59 | 50 | 42,0/ 5,29 | 41,0/ 5,76 | 13% | 4/6 |
| | 2530 | ACTB | 7p22.1 | Q96HG5 | -4,49 | 69 | 40 | 42,0/ 5,29 | 44,0/ 6,06 | 19% | 6/15 |
| | 2658 | ACTB | 7p22.1 | Q96HG5 | -2,26 | 60 | 40 | 42,0/ 5,29 | 38,0/ 5,75 | 18% | 5/12 |
| Actina Citoplasmática 2 (ACTG) | 2608 | ACTG1 | 17q25.3 | P63261 | -5,06 | 59 | 50 | 42,1/ 5,31 | 41,0/ 5,76 | 13% | 4/6 |
| | 2530 | ACTG1 | 17q25.3 | P63261 | -4,49 | 69 | 40 | 42,1/ 5,31 | 44,0/ 6,07 | 19% | 6/15 |
| | 2658 | ACTG1 | 17q25.3 | P63261 | -2,26 | 60 | 40 | 42,1/ 5,31 | 38,0/ 5,75 | 18% | 5/12 |
| Albumina (ALBU) | 2302 | ALB | 4q13.3 | Q9P157 | 6,51 | 164 | 100 | 71,3/ 5,92 | 61,0/ 6,36 | 19% | 11/11 |
| | 2456 | ALB | 4q13.3 | Q9P157 | -2,47 | 99 | 100 | 71,3/ 5,92 | 49,0/ 6,27 | 16% | 7/8 |
| Complexo citocromo bc1 subunidade 1 (QCR1) | 2443 | UQCRC1 | 3p21.31 | P31930 | -4,17 | 220 | 40 | 53,2/ 4,94 | 50,0/ 5,83 | 50% | 19/44 |
| Fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF) | 2420 | SERPINF1 | 17p13.3 | P36955 | -2,58 | 86 | 50 | 46,4/ 5,97 | 50,0/ 5,89 | 16% | 8/ 20 |
| Proteína dissulfeto-isomerase A3 (PDIA3) | 2337 | PDIA3 | 15q15.3 | P30101 | -2,75 | 194 | 50 | 57,1/ 5,98 | 59,0/ 6,06 | 33% | 14/17 |
| Proteína dissulfeto-isomerase A6 (PDIA6) | 2413 | PDIA6 | 2p.25.1 | Q15084 | -2,07 | 74 | 50 | 48,4/ 4,95 | 53,0/ 5,28 | 15% | 5/7 |
| Proteína de ligação da Vitamina D (VTDB) | 2317 | GC | 4q13.3 | P02774 | -2,68 | 163 | 50 | 54,5/ 5,40 | 55,0/ 5,33 | 32% | 12/19 |
| Tropomiosina cadeia alfa-3 (TPM3) | 2740 | TPM3 | 1q21.3 | P06753 | -2,07 | 65 | 40 | 32,8/ 4,68 | 33,0/ 4,85 | 20% | 6/13 |
| Tubulina cadeia alfa-1A (TBA1A) | 2320 | TUBA1A | 12q13.12 | Q71U36 | -2,26 | 140 | 40 | 50,7/ 4,94 | 60,0/ 5,31 | 35% | 10/16 |
| Tubulina cadeia alfa-1B (TBA1B) | 2320 | TUBA1B | 12q13.12 | P68363 | -2,26 | 140 | 40 | 50,8/ 4,94 | 60,0/ 5,31 | 35% | 10/16 |
| Tubulina cadeia alfa-1C (TBA1C) | 2320 | TUBA1C | 12q13.12 | Q9BQE3 | -2,26 | 121 | 40 | 50,5/ 4,96 | 60,0/ 5,31 | 32% | 9/16 |
| Tubulina cadeia alfa-3C/D (TBA3C) | 2320 | TUBA3C | 13q12.11 | Q13748 | -2,26 | 104 | 40 | 50,6/ 4,97 | 60,0/ 5,31 | 30% | 8/16 |
| Tubulina cadeia alfa-3E (TBA3E) | 2320 | TUBA3E | 2q21.1 | Q6PEY2 | -2,26 | 86 | 40 | 50,5/ 5,00 | 60,0/ 5,31 | 26% | 7/16 |
| Tubulina cadeia alfa-4A (TBA4A) | 2320 | TUBA4A | 2q35 | P68366 | -2,26 | 86 | 40 | 50,6/ 4,95 | 60,0/ 5,31 | 26% | 7/16 |
| Tubulina cadeia beta (TBB5) | 2443 | TUBB | 6p21.33 | P07437 | -4,17 | 81 | 40 | 50,0/ 4,78 | 50,0/ 5,83 | 25% | 10/44 |
| Tubulin cadeia alfa-8 (TBA8) | 2320 | TUBA8 | 22q11.21 | Q9NY65 | -2,26 | 70 | 40 | 50,7/ 4,94 | 60,0/ 5,31 | 22% | 6/16 |
| Tubulina cadeia beta-2A (TBB2A) | 2443 | TUBB2A | 6p25.2 | Q13885 | -4,17 | 57 | 40 | 50,2/ 4,78 | 50,0/ 5,83 | 21% | 8/44 |
| Tubulina cadeia beta-2B (TBB2B) | 2443 | TUBB2B | 6p25.2 | Q9BVA1 | -4,17 | 57 | 40 | 50,3/ 4,78 | 50,0/ 5,83 | 21% | 8/44 |

FONTE: autor (2011) NOTA: **Spot ID** - identificação do *spot* no gel; **MASCOT Score** – parâmetro do software Mascot que representa confiança de $p < 0,05$ na identificação da proteína; **Massa molecular (MM) e pl Teórico** valores obtidos do banco de dados; **Massa molecular (MM) e pl Observado** – valores obtidos através da análise de imagem. **Cobertura**: porcentagem da seqüência da proteína que foi identificada. **Número de peptídeos sobrepostos**: corresponde aos picos de massa obtidos com a *MS* e que foram pareados com as massas teóricas, provenientes da clivagem *in silico*. **Nível diferencial do Spot** – diferença no nível de expressão diminuída das proteínas em relação ao carcinoma ductal.

TABELA 04 - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MS/MS

| Nome da proteína (Sigla) | Spot ID | Gene | Região Crom. | Código UniprotKB | Nível diferencial do Spot | MASCOT Score | Peptídeos identificados por MS/MS | Tolerância (ppm) | MM (kDa) / pI Teórico | MM (kDa) / pI Observado |
|--|---------|---------|--------------|------------------|---------------------------|--------------|-----------------------------------|------------------|-----------------------|-------------------------|
| Actina, músculo liso aórtico (ACTA) | 829 | ACTA2 | 10q23.31 | P62736 | 4,49* | 37 | SYELPDGQVITIGNER | 100 | 42,3/ 5,23 | 43,0/ 6,02 |
| Actina - relacionada a proteína 3 (ARP3) | 723 | ACTR3 | 2q14.1 | P61158 | 2,58* | 40 | HGIVEDWDLMER | 100 | 47,7/ 5,61 | 54,0/ 5,98 |
| Albumina (ALBU) | 1030 | ALB | 4q13.3 | Q9P157 | — | 29 | KVPQVSTPTLVEVSR | 100 | 71,3/ 5,92 | 31,0/ 5,46 |
| Endoplasmina (ENPL) | 676 | HSP90B1 | 12q23.3 | P14625 | — | 33 | EEEAIQLDGLNASQIR | 100 | 92,6/ 4,76 | 57,0/ 4,88 |
| Proteína dissulfeto-isomerase A6 (PDIA6) | 717 | PDIA6 | 2p.25.1 | Q15084 | 2,07* | 24 | LAAVDATVNQVLASR | 100 | 48,4/ 4,95 | 51,0/ 5,28 |
| Triose-fosfato isomerase (TPIS) | 2843 | TPI1 | 12p.13.31 | P60174 | -2,44** | 54 | VPADTEVVCAPPTAYIDFAR | 100 | 26,9/ 6,45 | 28,0/ 6,49 |

FONTE: autor (2011)

NOTA: **Spot ID** - identificação do *spot* no gel; **MASCOT Score** – parâmetro do software Mascot que representa confiança de $p < 0,05$ na identificação da proteína; **Massa molecular (MM) e pI Teórico** valores obtidos do banco de dados; **Massa molecular (MM) e pI Observado** – valores obtidos através da análise de imagem. **Nível diferencial do Spot** – diferença no nível de expressão das proteínas em relação ao carcinoma lobular* e ductal**, o valor negativo apresenta o nível de expressão diminuído. (-) *spot* presente apenas no carcinoma ductal.

TABELA 05 - PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO CARCINOMA DUCTAL E LOBULAR E SUAS PRINCIPAIS FUNÇÕES

| Código UniprotKB | Nome da proteína (<i>Gene</i>) | Processo Biológico | Função Molecular | Localização |
|---------------------------------|--|---|--|--|
| 1. Proteínas Estruturais | | | | |
| Q96HG5 | Actina Citoplasmática 1 /Beta-actina (<i>ACTB</i>) | Motilidade Celular | Componente estrutural do citoesqueleto/ proteína de ligação | Citoplasma, citoesqueleto, citosol e axônio. |
| P63261 | Actina Citoplasmática 2 /Gama-actina (<i>ACTG</i>) | Motilidade Celular / resposta a estímulos | Componente estrutural do citoesqueleto/ proteína de ligação | Citoplasma, citoesqueleto e citosol. |
| P62736 | Actina, músculo liso aórtico/ alfa-actina (<i>ACTA2</i>) | Contratilidade celular/ resposta viral | Constituinte principal do aparato contrátil/ Proteína de ligação | Tecido muscular |
| P61158 | Actina - relacionada a proteína 3 (<i>ACTR3</i>) | Regulação da polimerização da actina | Proteína de ligação ao ATP | Citoplasma, citoesqueleto |
| P52907 | F-actina-capping proteína de subunidade alfa-1 (<i>CAPZA1</i>) | Organização do citoesqueleto de actina | Proteína de ligação à actina | Citoplasma, citoesqueleto |
| P06753 | Tropomiosina cadeia alfa-3 (<i>TPM3</i>) | Regulação da contração muscular | Proteína de ligação à actina | Citoplasma e citoesqueleto |
| Q71U36 | Tubulina cadeia alfa-1A (<i>TUBA1A</i>) | Estabilização de microtubulos/ Processos celulares (motilidade, progressão do ciclo celular, diferenciação) | Proteína de ligação/ atividade estrutural e hidrolase | Citoesqueleto, citoplasma e microtubulo |
| P68363 | Tubulina cadeia alfa-1B (<i>TUBA1B</i>) | Estabilização de microtubulos/ Processos celulares (motilidade, progressão do ciclo celular, diferenciação) | Proteína de ligação/ atividade estrutural e hidrolase | Citoesqueleto, citoplasma e microtubulo |
| Q9BQE3 | Tubulina cadeia alfa-1C (<i>TUBA1C</i>) | Estabilização de microtubulos/ Processos celulares (motilidade, progressão do ciclo celular, diferenciação) | Proteína de ligação/ atividade estrutural | Citoesqueleto, citoplasma e microtubulo |

(continua)

| Código UniprotKB | Nome da proteína (Gene) | Processo Biológico | Função Molecular | Localização |
|-------------------------|---|--|---|---|
| Q6PEY2 | Tubulina cadeia alfa-3E (<i>TUBA3E</i>) | Estabilização de microtubulos/ Processos celulares (motilidade, progressão do ciclo celular, diferenciação) | Proteína de ligação/ atividade estrutural e hidrolase | Citoesqueleto, citoplasma e microtubulo |
| P68366 | Tubulina cadeia alfa-4A (<i>TUBA4A</i>) | Estabilização de microtubulos/ Processos celulares (motilidade, progressão do ciclo celular, diferenciação) | Proteína de ligação/ atividade estrutural e hidrolase | Citoplasma, microtubulo e região extracelular |
| Q13748 | Tubulina cadeia alfa-3C/D (<i>TUBA3C</i>) | Estabilização de microtubulos/ Processos celulares (motilidade, progressão do ciclo celular, diferenciação) | Proteína de ligação/ atividade estrutural e hidrolase | Citoplasma, microtubulo e região extracelular |
| Q9NY65 | Tubulina cadeia alfa-8 (<i>TUBA8</i>) | Estabilização de microtubulos/ Processos celulares (motilidade, progressão do ciclo celular, diferenciação) | Proteína de ligação/ atividade estrutural e hidrolase | Citoesqueleto, citoplasma e microtubulo |
| Q13885 | Tubulina cadeia beta-2A (<i>TUBB2A</i>) | Estabilização de microtubulos/ Processos celulares (motilidade, progressão do ciclo celular, diferenciação) | Proteína de ligação a GTP/ atividade estrutural e hidrolase | Citoesqueleto, citoplasma e microtubulo |
| Q9BVA1 | Tubulina cadeia beta-2B (<i>TUBB2B</i>) | Estabilização de microtubulos/ Processos celulares (motilidade, progressão do ciclo celular, diferenciação) | Proteína de ligação/ atividade estrutural e hidrolase | Citoesqueleto, citoplasma e microtubulo |
| P07437 | Tubulina cadeia beta (<i>TUBB</i>) | Estabilização de microtubulos/ Processos celulares (motilidade, progressão do ciclo celular, diferenciação) | Proteína de ligação a GTP e moléculas MHC de classe I / atividade estrutural e GTPase | Citoplasma, microtubulo, membrana, citoesqueleto e citosol. |
| P08670 | Vimentina (<i>VIM</i>) | Motilidade celular / processo celular (crescimento e sinalização) | Proteína de ligação, Proteína com atividade estrutural | Citoplasma, membrana, axônio e citoesqueleto |

(continuação)

| Código UniprotKB | Nome da proteína (Gene) | Processo Biológico | Função Molecular | Localização |
|--|--|---|--|---|
| 2. Enzimas metabólicas | | | | |
| P31930 | Complexo citocromo bc1 subunidade 1 (<i>UQCRC1</i>) | Respiração aeróbica e transporte de elétrons | Atividade catalítica / Proteína de ligação ao Zn | Membrana, mitocôndria e membrana interna da mt |
| P60174 | Triosefosfato isomerase (<i>TPI1</i>) | Processo Metabólico de carboidratos/ glicólise | Proteína de ligação/ atividade de isomerase | Citoplasma, núcleo |
| 3. Chaperonas moleculares/ proteínas heat shock | | | | |
| P14625 | Endoplasmina (<i>HSP90B1</i>) | Transporte, resposta a estímulos (hipóxia, estresse), anti-apoptótico | Proteína de ligação | Citoplasma, retículo endoplasmático e membrana |
| P30101 | Proteína dissulfeto-isomerase A3 (<i>PDIA3</i>) | Sinalização celular (tradução), dobramento de proteínas, transporte de proteína ao núcleo e retenção no RE, regulação pró-apoptótica | Proteína de ligação/ atividade de isomerase | Citoplasma, retículo endoplasmático |
| Q15084 | Proteína dissulfeto-isomerase A6 (<i>PDIA6</i>) | Regulação da Homeostase Redox e processos biológicos / dobramento de proteínas | Ligação a proteínas / atividade de isomerase | Citoplasma, retículo endoplasmático, membrana e plaquetas |
| 4. Regulação da diferenciação e proliferação | | | | |
| P36955 | Fator derivado do epitélio pigmentado/PEDF (<i>SERPINF1</i>) | Proliferação celular, regulador negativo da angiogênese e positivo da neurogênese | Atividade de inibidor de endopeptidase tipo serina | Espaço extracelular |
| 5. Proteína de Ligação | | | | |
| Q9NRV9 | Proteína Heme-binding1 (<i>HEBP1</i>) | Remoção de porfirinogenio livre, ritmo circadiano | Proteína de ligação | Espaço extracelular. |
| 6. Transporte | | | | |
| P02774 | Proteína de ligação da Vitamina D /VDB (GC) | Processo metabólico e de transporte da Vitamina D | Proteína de ligação à actina e à vitamina D | Espaço extracelular |
| Q9P157 | Albumina sérica (<i>ALB</i>) | Regulação da pressão osmótica coloidal do sangue. Transporte de Zn / Resposta ao estresse/ sinalização celular/ regulação anti-apoptose | Proteína de ligação a Zn, lipídeos, cobre, metais | Espaço extracelular |

FONTE: o autor (2011) NOTA: Distribuição das 30 proteínas identificadas de acordo com sua função biológica em 6 categorias. A classificação foi feita com base nas informações disponíveis na literatura e nos bancos de dados do *UniProtKB/ Swiss-Prot* e do *GeneOntology*.

6.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA DIFERENCIAL NO TECIDO MAMÁRIO DE PACIENTES COM CARCINOMA DUCTAL E LOBULAR

A análise proteômica diferencial tem demonstrado ser uma ferramenta importante na pesquisa de novos biomarcadores de relevância clínica. No entanto, a aplicação dessas informações é bastante difícil, devido à complexidade biológica do câncer, a nível gênico, protéico, celular e tecidual. Embora muitos estudos venham sendo realizados para elucidar a carcinogênese mamária, ainda há muito a ser pesquisado. Com isso, pesquisas de expressão protéica diferencial em subtipos tumorais são essenciais para gerar dados que contribuam na classificação do câncer e na descoberta de potenciais marcadores. Neste estudo, avaliamos a diferença de expressão protéica no tecido mamário entre pacientes com carcinoma ductal (CD) e lobular (CL), histologicamente diagnosticados em graus I/II.

A variação encontrada no número de *spots* em cada amostra deste estudo se deve, provavelmente, às dificuldades próprias da análise proteômica do tecido mamário, principalmente a mudanças hormonais que podem alterar a expressão das proteínas, e também pelo câncer de mama ser extremamente heterogêneo, apresentando comportamento diferente em cada paciente.

A análise proteômica diferencial demonstrou diversas proteínas diferencialmente expressas entre as amostras de pacientes com CD e CL, em sua maioria com expressão aumentada em amostras ductais, sendo estas classificadas quanto à sua função com base no estudo de Pucci-minafra *et al.* (2006). Deste modo, as proteínas foram subdivididas em proteínas estruturais (64,7%), enzimas metabólicas (5,9%), chaperonas moleculares/ proteínas *heat shock* (9,8%), regulação da diferenciação e proliferação (2%), proteínas de ligação (2%) e de transporte (15,7%) (GRÁFICO 01).

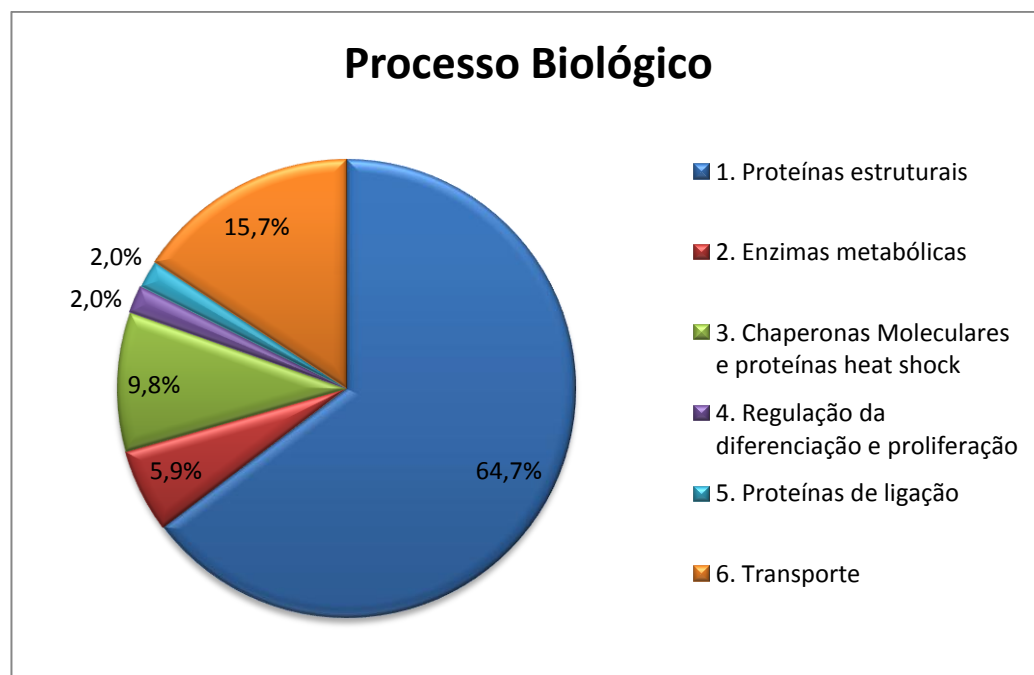


GRÁFICO 01 – CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS DE ACORDO COM SUA FUNÇÃO BIOLÓGICA

FONTE - o autor (2011)

NOTA - Distribuição das 30 proteínas identificadas de acordo com sua função biológica em 6 categorias. A classificação foi feita com base nas informações disponíveis na literatura e nos bancos de dados do *UniProtKB/ Swiss-Prot* e do *GeneOntology*.

6.6.1 Proteínas Estruturais

A maioria das proteínas identificadas pertence à classe de proteínas estruturais (64,7%, GRÁFICO 1). Foram detectados 13 *spots*, correspondendo a 17 proteínas diferentes: Actina citoplasmática 1/ beta-actina (ACTB - três isoformas), actina citoplasmática 2/ gama-actina (ACTG - três isoformas), alfa- actina músculo liso aórtico (ACTA), actina - relacionada a proteína 3 (ARP3), f-actina-capping proteína de subunidade alfa-1 (CAZA1), tropomiosina cadeia alfa-3 (TPM3), tubulina cadeia alfa-1^a (TBA1A - duas isoformas), tubulina cadeia alfa-1B (TBA1B - duas isoformas), tubulina cadeia alfa-1C (TBA1C - duas isoformas), tubulina cadeia alfa-3E (TBA3E), tubulina cadeia alfa-4A (TBA4A), tubulina cadeia alfa-3C/D (TBA3C), tubulina cadeia alfa-8 (TBA8), tubulina cadeia beta-2A (TBB2A), tubulina cadeia beta-2B (TBB2B), tubulina cadeia beta (TBB5) e vimentina (VIM).

O citoesqueleto é um sistema extremamente complexo e dinâmico, compreendendo proteínas estruturais formando polímeros (actina, tubulina e filamentos intermediários) e de várias proteínas com função regulatória. Além de representar o arcabouço da célula, está direta ou indiretamente envolvido em

diversos processos celulares, tais como polaridade celular, adesão, movimento celular, transporte intracelular e transdução de sinal. Alterações do citoesqueleto associadas ao câncer estão bem documentadas e têm sido utilizadas como parâmetros no diagnóstico de doenças, inclusive no câncer de mama (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2006).

Neste trabalho foi observado um aumento significativo das proteínas actinas nas amostras de carcinoma ductal. Estas são proteínas altamente conservadas, fundamentais para a migração celular. Dentre as proteínas de actina descritas em mamíferos, neste estudo foram identificados cinco tipos: CAZA1; ARP3; ACTA e ACTB/G, sendo que as duas últimas são responsáveis pela motilidade e sinalização das células tumorais (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2006). Durante a migração celular, o citoesqueleto de actina é dinamicamente remodelado. Com isso, fica claro que para elucidar o processo de migração das células cancerosas, será importante investigar os mecanismos subjacentes à regulação de actina e a inibição do processo de motilidade, informações que poderão auxiliar na terapêutica do câncer. Foram identificados outros reguladores da polimerização de actina, formando o complexo ARP2/3, apesar do mecanismo não estar bem descrito, têm gerado certo interesse em razão de ser um regulador chave da nucleação de filamentos de actina (YAMAZAKI *et al.*, 2005).

Dentre as actinas identificadas, temos a proteína 3 relacionada a actina (ARP3 – *spot* 723), codificada pelo gene *ACTR3* (*ARP3 actin-related protein 3 homolog*), localizado no cromossomo 2 (2q14.1) (*Ensembl*, 2011). A identificação feita por seqüenciamento desta proteína por MS/ MS, apresentou os valores de MM/pl observados (54,0 kDa/ 5,98) muito próximos do esperado (47,7 kDa/ 5,61). Juntamente com a ARP2 e outras cinco subunidades, elas formam o complexo ARP2/3, complexo cuja ativação é fundamental para a formação de uma rede de filamentos de actina (GALLETTA *et al.*, 2008).

Também observamos que a proteína alfa - actina de músculo liso aórtico (ACTA – *spot* 829) apresenta expressão de 4,49 vezes maior no CD do que no CL. Esta proteína é codificada pelo gene *ACTA2*, localizado no cromossomo 10 (10q23.31) (*Ensembl*, 2011). A identificação desta proteína realizada por seqüenciamento por meio de MS/MS, apresentou o valor de MM observado (43,0 kDa) muito próximo do esperado (42,3 kDa). Dentre as dez proteínas identificadas

que tiveram uma variação do *pI* acima de 0,6 em relação ao esperado, a ACTA apresentou uma diferença de 0,79. Normalmente, a presença de grupos fosfatos ácidos provocam alteração do *pI* em proteína fosforilada, alterando a localização desta no gel em relação ao que era esperado, dependendo do número e sítio que a fosforilação ocorre (CORTESI *et al.*, 2009).

No mapa bidimensional, é difícil distinguir a actina citoplasmática 1 e a 2 (ACTB/G), por terem grande homologia, diferindo apenas por quatro aminoácidos na região amino-terminal, sendo comum identificar simultaneamente estas proteínas no mesmo *spot* (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2007). Neste trabalho, estas proteínas foram identificadas nos *spots* 886, 2608, 2530 e 2658, apresentando três isoformas protéicas, por estarem localizadas em posições diferentes no gel. As isoformas das ACTB/G encontradas apresentaram uma distribuição pelo gel bem semelhante com o que era esperado de acordo com os bancos de dados; foi observada uma pequena variação de massa molecular de 38 a 41 kDa e o *pI* variando de 5,75 a 5,81 (FIGURA 10). Como exceção, o *spot* 2530 correspondente a ACTB/G, apresentou variação do ponto isoelétrico superior a 0,6 do valor observado para o teórico e a taxa de cobertura da sequência foi abaixo de 20%. Entretanto, as identificações destas proteínas atenderam aos critérios de peptídeos sobrepostos (6/15), valor de *score* (69), pequena variação da MM e a tolerância a erro extremamente baixa (40ppm). Por esta razão, os dados desta identificação foram mantidos neste trabalho. Adicionalmente, é possível que esta proteína esteja modificada por fosforilação, pois quando a proteína é identificada em mais de um ponto, há grande possibilidade da sua função ser regulada por modificações pós-traducionais.

De acordo com o banco de dados do *Ensembl* (2011), a actina citoplasmática 1 é codificada pelo gene *ACTB* (*actin, beta*) localizado no cromossomo 7 (7p22.1), enquanto que a actina citoplasmática 2 é codificada pelo gene *ACTG1* (*actin, gamma 1*), localizado no cromossomo 17 (17q25.3).

Recentemente, trabalhos têm sugerido uma relação entre a organização da actina e mudanças na expressão das isoformas desta proteína com a capacidade das células tumorais formarem metástase. Nowak *et al.* (2005) demonstraram que a expressão das actinas é maior em linhagem celular de sarcoma invasivo do que em não-invasivo.

É importante ressaltar que o *spot* 886, identificado no CD, além de ter sido identificado como ACTB/G com o *score* de 70, foi também indicado pelo programa MASCOT como contendo as tubulinas de cadeia alfa 1A, 1B e 1C, com os mesmos valores de *score* (67), cobertura de sequência (19%) e número de peptídeos sobrepostos (6/17). A identificação destas proteínas foi considerada duvidosa, pois o *spot* 886 diferiu da posição esperada, apresentando uma diferença no *pI* observado de 0,85 a 0,87 comparado com o valor esperado e a diferença da MM variou de 20,79 a 21,26%, além da cobertura de sequência ter ficado abaixo de 20%. Esta identificação atendeu aos critérios de *score* acima de 56 e número de peptídeos sobrepostos e, por isso, os dados foram mantidos neste trabalho.

Outra proteína com função estrutural encontrada em ambos os tumores foi a tropomiosina cadeia alfa-3 (TPM3), sendo correspondente a esta proteína os *spots* 995 e 2740, identificadas no CD e CL, respectivamente. Ambos apresentaram o mesmo valor MM/*pI* observado (33 kDa/ 4,85), valores muito próximos aos esperados (32,8 kDa/ 4,68), e não diferiram em relação a posição esperada (FIGURA 11). Na análise comparativa, o nível de expressão desta proteína foi 2,07 vezes maior nas amostras de carcinoma ductal em relação às amostras de carcinoma lobular (dados apresentados nas TABELAS 2 e 3; e FIGURA 12). A TPM é uma proteína estrutural importante associada aos microfilamentos de actina. Inúmeras isoformas da TPM tem sido relatadas em linhagens celulares, inclusive em células tumorais de mama, e alguns casos sugerem que podem estar associadas ao potencial metastático de diversos tumores primários (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2007).

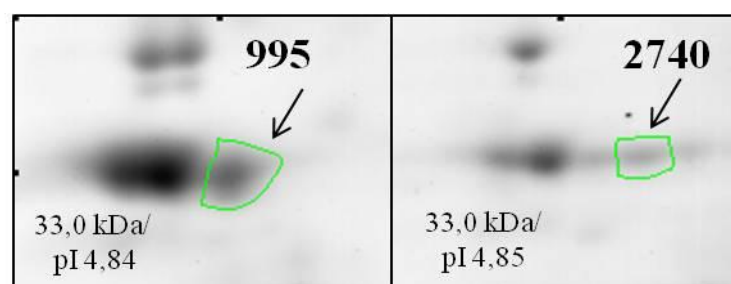


FIGURA 11 – DETALHES DOS *SPOTS* CORRESPONDENTES A PROTEÍNA TROPOMIOSINA CADEIA ALFA-3 DIFERENCIALMENTE EXPRESSA ENTRE O CD E CL

FONTE – Autor (2011)

NOTA- As setas indicam os *spots* identificados em ambos os tumores, com seus respectivos valores de massa molecular (em quilodalton) e ponto isoelétrico.

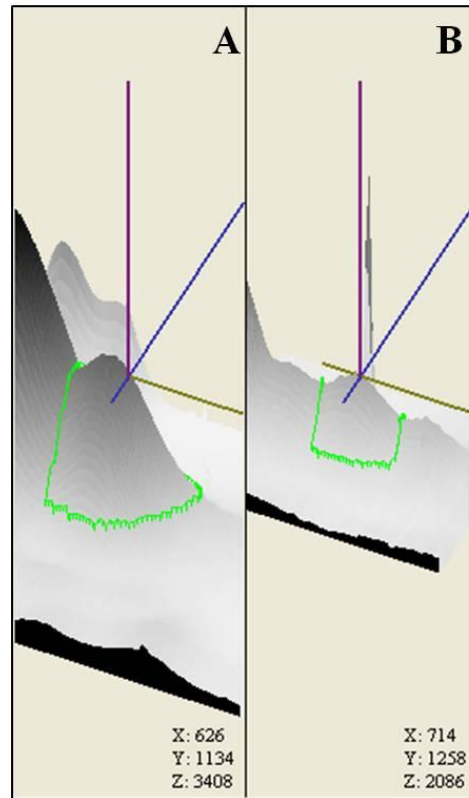


FIGURA 12 – IMAGEM TRIDIMENSIONAL DOS SPOTS DA TPM3

FONTE- autor (2011)

NOTA – **A** – spot 995 identificado no carcinoma ductal; **B** – spot 2740 identificado no carcinoma lobular. Coordenadas X,Y e Z geradas pelo programa *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0*.

A tropomiosina cadeia alfa-3 é codificada pelo gene *TPM3* (*tropomyosin 3*), localizado no cromossomo 1 (1q21.3) (*Ensembl*, 2011). De acordo com o banco de dados *UniProtKB/ Swiss-Prot*, isoformas desta cadeia da tropomiosina, originadas por *splicing* alternativo, já foram relatadas. A TPM está envolvida na regulação da contração muscular e desempenha um papel importante regulando os efeitos dos canais de Ca^{2+} na interação de actina-miosina (CAO; HUI; LIN, 2008).

A expressão diminuída da tropomiosina tem sido observada na transformação neoplásica de fibroblastos por oncogenes retrovirais, mutagênicos químicos e fatores de crescimento (FRANZEN *et al.*, 1996; CAO; HUI; LIN, 2008). Tem sido sugerido que a ausência de tropomiosina em células tumorais pode diminuir a estabilidade dos microfilamentos de actina devido à maior suscetibilidade a fatores de despolimerização, desempenhando um papel crucial na oncogênese. A desorganização nestes elementos do citoesqueleto pode alterar as células, a motilidade e as interações com outros elementos no espaço extracelular (FRANZEN *et al.*, 1996).

Neste trabalho, a expressão da TPM3 mostrou-se diminuída 2,07 vezes nas amostras de carcinoma lobular em relação ao ductal. Estudos publicados nos anos 90, demonstraram que a expressão da tropomiosina 1, 2, e 3 apresentava-se diminuída no carcinoma mamário, sugerindo que tais anormalidades podem exercer um papel importante na tumorigênese mamária (BHATTACHARYA *et al.*, 1990; FRANZEN *et al.*, 1993). Adicionalmente, trabalhos recentes confirmam que a expressão das isoformas da TPM está diminuída em tumores primários de mama, e que tumores metastáticos apresentam uma expressão relativamente alta da TPM1. Além disso, tumores de mama HER2-positivo demonstraram expressão elevada da TPM3, sugerindo que possam exercer um papel importante na disseminação das células tumorais neste tipo de câncer (LI *et al.*, 2006).

Quanto a identificação dos *spots* 658 e 2320, encontrados no CD e CL, respectivamente, o programa MASCOT indicou as tubulinas de cadeia alfa 1A, 1B, 1C, 4A, 3C, 8 e 3E (FIGURA 13). A variação nos valores de MM/pI de ambos os *spots* em relação ao esperado não foram significativas (dados apresentados no APÊNDICE 2). Estas proteínas atenderam aos critérios de *score* acima de 56, cobertura de seqüência acima de 20%, número de peptídeos sobrepostos acima de 4 e também não diferiram da posição esperada (dados apresentados nas TABELAS 02 e 03). Estes dados confirmaram que ambos os *spots*, identificados nos dois tumores, correspondem às mesmas proteínas, portanto foram considerados no número total de proteínas identificadas neste trabalho. Estas proteínas foram encontradas com intensidades diferentes entre os *spots* dos tumores estudados, apresentando níveis de expressão diferencial com intensidade relativa de 2,26 vezes maior no CD comparado ao CL (FIGURA 14).

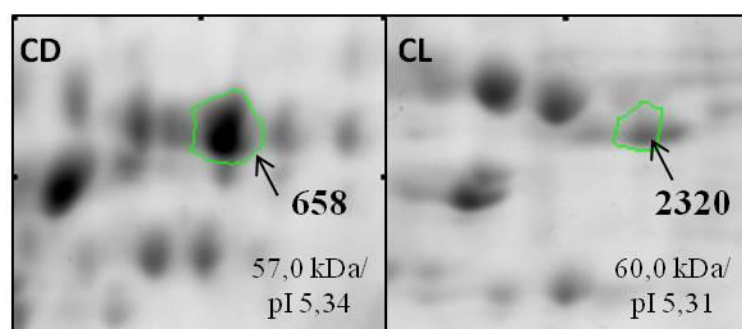


FIGURA 13 – DETALHES DOS *SPOTS* CORRESPONDENTES AS TUBULINAS DE CADEIA ALFA
 FONTE – Autor (2011)

NOTA- As setas indicam os *spots* identificados em ambos os tumores, com seus respectivos valores de massa molecular (em quilodalton) e ponto isoelétrico.

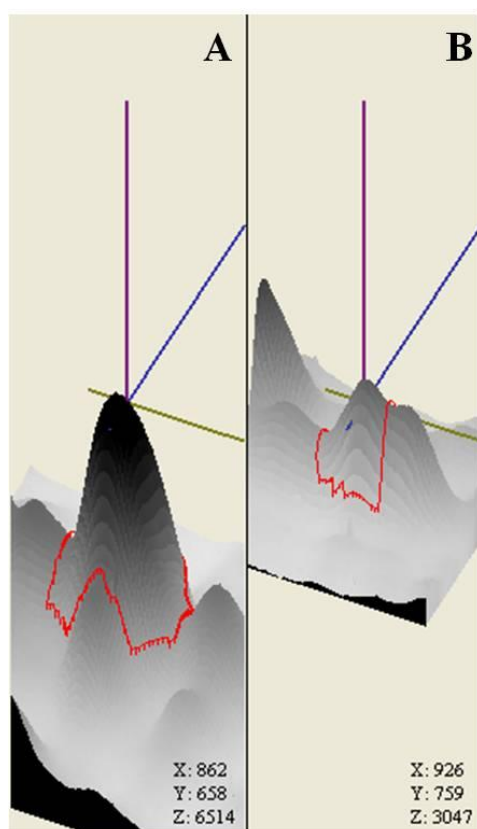


FIGURA 14 – IMAGEM TRIDIMENSIONAL DOS SPOTS DAS TUBULINAS DE CADEIA ALFA
 FONTE- autor (2011)

NOTA – **A** – spot 658 identificado no carcinoma ductal; **B** – spot 2320 identificado no carcinoma lobular. Coordenadas X,Y e Z geradas pelo programa *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0*.

As tubulinas-beta (TBB2A, TBB2B e TBB5) que foram identificadas no *spot* 2443, encontradas no carcinoma lobular, não corresponderam à identificação feita no *spot* 720, encontrado no carcinoma ductal, que foi identificado como sendo a proteína albumina. O pareamento destas proteínas foi considerado duvidoso, porque apesar de apresentarem a mesma localização nos géis de referência, a identificação protéica foi distinta. Vale lembrar, que o *spot* 720, diferiu significativamente da posição esperada e foram identificadas 6 isoformas da proteína albumina neste trabalho (apresentado no APÊNDICE 2). Entretanto, a identificação das tubulinas-beta atenderam aos critérios de *score* acima de 56, cobertura de seqüência acima de 20%, número de peptídeos sobrepostos acima de 4 e tolerância de erro foi de 40 partes por milhão (ppm).

Provavelmente a identificação dessas diferentes proteínas para cada um destes *spots* pelo programa MASCOT, seja devida à similaridade entre as seqüências de aminoácidos das cadeias da tubulina, resultando em vários peptídeos coincidentes após a digestão tríptica. Para maior confiabilidade na identificação e

distinção entre os diversos tipos de tubulinas, o ideal seria obter a seqüência de aminoácidos através de espectrometria de massa em *tandem* (MS/ MS).

As proteínas dos microtúbulos, as tubulinas-alfa, também apresentaram aumento da expressão nas amostras de carcinoma ductal em relação ao carcinoma lobular. Os microtúbulos são o principal componente do citoesqueleto e estão envolvidos numa variedade de funções celulares, tais como, motilidade celular, transporte intracelular, progressão do ciclo celular e diferenciação. Estas são estruturas extremamente dinâmicas, compostas por heterodímeros de tubulinas alfa e beta que juntamente com outras proteínas estruturais formam o fuso mitótico (LIANG; MACRAE, 1997; TUMA *et al.*, 2010). Alfa-tubulinas compartilham 36-42% de identidade com as beta-tubulinas, constituindo, assim, duas famílias altamente conservadas de proteínas dentro da superfamília das tubulinas (OAKLEY, 2000).

Há mais de 40 anos, agentes anti-microtúbulos foram aprovados para serem utilizados como quimioterápicos, sendo que o mais bem sucedido na clínica foi o taxano, comercialmente chamado de paclitaxel, amplamente utilizado no tratamento de diversas neoplasias, incluindo os cânceres de pulmão, ovário e mama. Apesar da sua ampla utilização, essas terapias possuem várias limitações, principalmente no que se refere à sensibilidade inicial a estas drogas, que levam à resistência terapêutica (TUMA *et al.*, 2010).

Vários trabalhos demonstram que a sensibilidade aos taxanos está correlacionada com os níveis de tubulina polimerizada em tecidos normais *versus* tumorais. Estes níveis estão associados, por sua vez, à expressão diferencial de proteínas relacionadas aos microtúbulos e a reguladores como a oncoproteína 18 (DOZIER *et al.*, 2003), que atua desestabilizando os microtúbulos e que já foi encontrada super-expressa em tumores mamários altamente proliferativos e no câncer de ovário maligno (CASSIMERIS, 2002). Por outro lado, estudos clínicos preliminares mostram que a tubulina beta apresenta uma resposta positiva ao taxano. Sugere-se que a superexpressão desta tubulina poderia ser preditivo a resposta positiva a esta droga (CORTESI *et al.*, 2009).

A vimentina é codificada pelo gene *VIM* (*vimentin*), localizado no cromossomo 10 (10p13) (*Ensembl*, 2011). Esta proteína foi observada a partir do *spot* 834, apresentando uma expressão diferencial de 4,69 vezes maior nas amostras de carcinoma ductal em relação ao lobular. Observou-se que os valores de

MM/ pI observados (43,0 kDa/ 4,96) diferiram pouco dos valores esperados (53,6 kDa/ 5,06), mantendo-se de acordo com os parâmetros estabelecidos quanto a localização esperada. A identificação desta proteína atendeu aos critérios de cobertura (33%), número de peptídeos sobrepostos (15/19) e de score (188), acima do mínimo (56), demonstrando não ser um evento ao acaso. Tais evidências apresentam uma alta confiabilidade de que este *spot* corresponda realmente a vimentina, relatada no banco de dados.

O espectro do *spot* 2575, que correspondente ao 834 na amostra de carcinoma lobular, não obteve identificação positiva no programa MASCOT, devido principalmente a baixa quantidade de peptídeos presente na amostra, representado visualmente por um *spot* fraco no gel (FIGURA 10). Mesmo após seguir o protocolo de concentração de peptídeos, não foi possível identificá-lo, devido à perda de peptídeos durante a extração.

A vimentina é uma proteína estrutural do citoesqueleto, membro da família dos filamentos intermediários de classe III, encontrada geralmente em células não-epiteliais, especialmente nas células mesenquimais, sendo que também pode ser expressa em células epiteliais quando são estimuladas por fatores de crescimento. Desempenha funções biológicas relacionadas à motilidade celular, contribuindo na dinâmica de processos celulares (crescimento e sinalização), resposta imune e na estabilização da arquitetura citoplasmática (SCHULTZE *et al.*, 2010; *UniProtKB*, 2011).

No câncer, a expressão da vimentina está associada ao fenótipo maligno diferenciado, maior capacidade de motilidade invasiva, resistência a drogas e ao pior prognóstico. A co-expressão de citoqueratinas e vimentina está envolvida num processo típico de transição epitélio-mesenquimal (EMT) durante o desenvolvimento do câncer de mama. A diminuição da expressão de vimentina pode alterar a EMT da célula normal e a diferenciação celular. Quando aumentada pode ser um fator de predisposição a fenótipos alterados associados à EMT que, por sua vez, podem favorecer o desenvolvimento do câncer (BETANCOURT *et al.*, 2010). A identificação de proteínas específicas de células mesenquimais em lesões iniciais de mama podem fornecer informações sobre os mecanismos de invasão e metástase do carcinoma de mama.

Estudo realizado por Domagala *et al.*(1993) caracteriza o perfil imuno-histoquímico do carcinoma lobular invasor, sugerindo que a ausência de expressão imuno-histoquímica da vimentina está freqüentemente mais associada ao carcinoma lobular do que ao ductal. Os resultados deste trabalho apontam para subjacentes diferenças biológicas entre os dois subtipos tumorais. OU *et al.* (1996), demonstraram que a vimentina está associada ao aumento da capacidade de proliferação e invasibilidade tumoral observados em linhagens tumorais de mama. Além disso, a expressão aumentada desta proteína está diretamente associada ao mau prognóstico de pacientes sem invasão de linfonodos (linfonodo negativo) e também de pacientes com carcinoma ductal.

A maioria das proteínas identificadas neste trabalho é importante na regulação da organização do citoesqueleto, estando também envolvidas em vários outros processos celulares.

6.6.2 Enzimas Metabólicas

Neste trabalho, também foram encontradas duas proteínas com funções metabólicas: a proteína UQCRC1 (*ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1*), também conhecida como CRC1 e QCR1, componente do Complexo citocromo bc1, subunidade 1 (*spot* 2443), codificada pelo gene *UQCRC1*, localizado no cromossomo 3 (3p21.31) e a proteína triose-fosfato isomerase (TPIS – *spots* 1072 e 2843), codificada pelo gene (*TPI1*), localizado no cromossomo 12 (12p.13.31) (*Ensembl*, 2011).

Identificou-se a QCR1 no *spot* 2443 nas amostras de carcinoma lobular, contudo na análise comparativa este *spot* foi pareado ao 720 da amostra de carcinoma ductal, sendo que a identificação deste último foi positiva para a proteína albumina. Este resultado demonstra que esta proteína considerada diferencialmente expressa no CD não corresponde à mesma proteína expressa nas amostras de CL. Entretanto, a identificação desta proteína foi mantida neste trabalho por vários motivos. Primeiro, porque a identificação da proteína albumina no *spot* 720, por ser uma proteína extremamente abundante pode ter impedido a identificação das outras proteínas, devido principalmente a albumina se ligar às proteínas menos abundantes. Segundo, a identificação da proteína QCR1 atendeu aos critérios de

MM, cobertura de sequência (50%), peptídeos sobrepostos (19/44), tolerância de 40 ppm e o valor de score igual a 220, sendo bastante alto. O único dado que diferiu foi o valor do ponto isoelétrico que variou 0,89 do valor esperado, indicativo de modificação pós-traducional desta proteína.

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela produção de energia na maioria das células. As proteínas mitocondriais estão envolvidas na fosforilação oxidativa, ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs), oxidação de ácidos graxos, e outros. Além disso, estas proteínas desempenham papel importante na sinalização de cálcio e apoptose. Dentre estes sistemas, a fosforilação oxidativa é composta essencialmente pela cadeia de transporte de elétrons (complexos I ao IV) e pelo complexo da ATP sintetase F1FO (complexo V). Os componentes da cadeia respiratória localizam-se na membrana interna da mitocôndria (KULAWIEC *et al.*, 2006; TEXEIRA, 2009). Quando ocorrem mutações no DNA da organela, que influenciam no seu funcionamento, é desencadeada uma resposta mitocondrial retrógrada, que consiste em uma via de sinalização da mitocôndria para o núcleo, levando a alterações de expressão em genes nucleares com o objetivo de compensar o metabolismo celular. Como mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) já foram detectados em todos os tipos de câncer, Kulawiec *et al.* (2006) utilizaram abordagem proteômica para determinar as modificações nucleares causadas pela depleção de mtDNA, identificando a proteína QCR1 como uma das alteradas, sugerindo sua participação na resposta retrógrada. Esta proteína é codificada no núcleo e localizada na membrana interna da mitocôndria, sendo que neste experimento mostrou-se quase 10 vezes menos expressa na linhagem com ausência de mitocôndrias. Na validação com imunohistoquímica, foi visto que 74% dos casos de carcinoma de mama apresentavam expressão da proteína QCR1, sugerindo importante ação na tumorigênese. A presença desta proteína exclusivamente nos carcinomas lobulares na amostra utilizada no presente trabalho pode sugerir a presença de mutações no mtDNA em maior frequência nos ductais, mas outros experimentos devem ser realizados para testar esta hipótese.

Outra proteína encontrada em ambos os tumores foi a triose-fosfato isomerase (TPIS), identificada pelos *spots* 1072 e 2843, no CD e CL respectivamente (FIGURA 10). Tal proteína apresentou uma variação pequena de massa molecular comparada com o que era esperado, e os valores de pI

observados (6,58 e 6,49) foram muito próximos do valor teórico (6,45) (FIGURA 15). Enfatiza-se que dentre os parâmetros de identificação por MS, o *spot* 1072 (expresso no CD) apresentou um grande número de peptídeos sobrepostos (12/26), cobertura da sequência bem alta (60%), tolerância de erro (40 ppm) e um alto valor de *score* (174). A identificação do *spot* 2843, expresso no CL, foi realizada por espectrometria de massa em *tandem* (MS/ MS), lembrando que a obtenção da sequência de aminoácidos através dessa técnica gera maior confiabilidade na identificação e possibilita distinguir entre os diferentes tipos desta proteína. Com base no banco de dados *UniProtKB/ Swiss-Prot* sugere-se que os *spots* 1072 e 2843 correspondem a isoforma 2 da proteína triose-fosfato isomerase, pois apresentaram valores de MM/ pI observados (28,0 kDa/ 6,58 - 6,49) muito próximos dos valores esperados (27,1 kDa/ 6,45) para a isoforma-2, resultante de *splicing* alternativo.

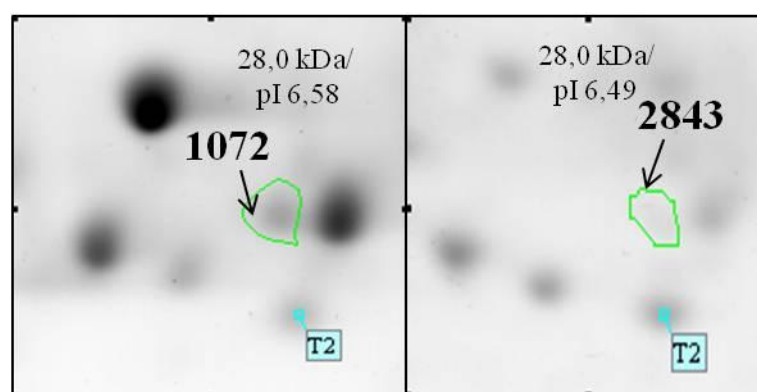


FIGURA 15 – DETALHES DOS SPOTS CORRESPONDENTES A PROTEÍNA TRIOSE-FOSFATO ISOMERASE

FONTE – autor (2011)

NOTA- As setas indicam os *spots* identificados em ambos os tumores, com seus respectivos valores de massa molecular (em quilodalton) e ponto isoelétrico. T2 destacado no quadro azul representa um dos *spots* utilizados para pareamento entre o gel *master*

Esta proteína foi 2,44 vezes mais expressa no CD do que em CL, resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Cortesi *et al.* (2009) investigando marcadores de resposta à quimioterapia, estudaram proteínas secretadas no fluído intersticial tumoral (pacientes com câncer de mama) e normal e observaram um aumento da expressão da proteína TPIS, entre outras, nos pacientes com boa resposta, concluindo que este aumento pode ser preditivo de resposta positiva a quimioterápicos. A triose-fosfato isomerase é uma enzima que catalisa a interconversão reversível de D-gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato, envolvida na gliconeogênese, glicólise e síntese de triglicerídeos. Poucos estudos

analisaram a participação desta proteína na tumorigênese. O trabalho de ZHANG *et al.* (2005) encontrou esta proteína superexpressa nas pacientes com câncer de mama HER2-positivo, corroborando com o nosso resultado, pois dentre as pacientes com carcinoma ductal estudadas, duas apresentaram HER2-positivo. Outro estudo com linhagem celular de carcinoma renal não encontrou diferenças no perfil de expressão desta proteína em relação ao epitélio renal normal (LICHTENFELS *et al.*, 2003). Considerando-se a função da proteína na geração de energia, pode-se supor que seja importante na defesa contra o desenvolvimento tumoral. Já a sugestão de Cortesi *et al.* (2009), de que possa ser preditiva de resposta à terapia, é bastante interessante, pois levanta a possibilidade de indução da via energética como uma abordagem terapêutica. O significado da expressão diferencial entre os subtipos ductal e lobular identificado na amostra utilizada permanece em aberto.

6.6.3 Chaperonas moleculares/ proteínas *heat shock*

As proteínas da classe **Chaperonas moleculares/ proteínas *heat shock*** representam um mecanismo de defesa altamente conservado das células contra as condições de estresse ambiental, tais como calor e choque oxidativo, presentes em diversas condições patológicas, incluindo o câncer. A consequência dos danos provocados pelo estresse é a indução da expressão de proteínas *heat shock*, das quais as chaperonas moleculares representam um importante grupo. As chaperonas apresentam a capacidade de interagir com outras proteínas para auxiliar no dobramento (*folding*), reparo ou na degradação protéica, atuando, portanto, como co-reguladoras da maquinaria do ciclo celular e da homeostase das proteínas (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2006).

Nesta classe funcional foram identificadas a endoplasmina (ENPL – *spot* 676), proteína dissulfeto-isomerase A3 (PDIA3 – *spots* 665/ 2337), e a proteína dissulfeto-isomerase A6 (PDIA6 – *spots* 717/ 2413), esta última apresentando duas isoformas resultante de *splicing* alternativo (Ensembl, 2011; UniProtKB/ Swiss-Prot, 2011).

Na análise comparativa a endoplasmina foi encontrada com aumento de expressão apenas nas amostras de carcinoma ductal. Apesar do *spot* 676 não apresentar diferença estatística ($p < 0.1$), foi selecionado para análise por

espectrometria de massas, em razão de visualmente e também pela análise feita pelo programa, ter demonstrado a expressão desta proteína apenas no CD. A ENPL é codificada pelo gene *HSP90B1*, localizado no cromossomo 12 (12q23.3) (Ensembl, 2011). Dentre todas as proteínas identificadas, foi uma das que apresentou a maior variação de massa, comparando o valor observado (57 kDa) com o que era esperado (92,6 kDa); entretanto como esta proteína foi identificada por MS/MS, a identificação foi considerada positiva devido a esta técnica apresentar maior confiabilidade quanto a determinação protéica (FIGURA 16).

Pucci-minafra *et al.* (2006), analisando linhagens celulares neoplásicas de mama, obtiveram 3 isoformas da proteína endosplasmina, componente da família HSP90, que atua no processamento e transporte de proteínas secretadas, na resposta a estímulos (hipóxia, estresse) e também está envolvida no processo anti-apoptótico. Bartkowiak *et al.* (2010) observaram a expressão aumentada desta proteína em modelos celulares mimetizando condições bastante adversas, como as encontradas pelas células metastáticas (hipóxia, hipoglicemia, pH ácido etc.) sugerindo que esta contribua para a sobrevivência das células em condições adversas, inclusive após a quimioterapia. Desta forma, a endoplasmina pode ser considerada um marcador de mau prognóstico.

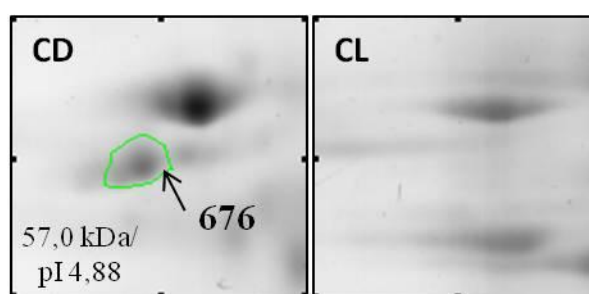


FIGURA 16 – DETALHES DO SPOT CORRESPONDENTE A PROTEÍNA ENDOPLASMINA
FONTE – Autor (2011)

NOTA - A seta indica o spot identificado somente no carcinoma ductal (CD), com seus respectivos valores de massa molecular (em quilodalton) e ponto isoelétrico.

Estudo comparativo do proteoma, realizado em amostras de tecido mamário tumoral e de tecido normal adjacente, apresentou aumento de expressão das proteínas PDIA3 e PDIA6 no carcinoma mamário (ALLDRIDGE *et al.*, 2008). Outro trabalho demonstrou que a expressão da PDIA3 apresentou-se 5 vezes maior na linhagem celular de adenocarcinoma de mama (MCF7) do que no controle (BIANCHI *et al.*, 2005). A análise proteômica diferencial, no presente estudo, também

apresentou aumento significativo na expressão destas proteínas nas amostras de CD quando comparados às amostras de CL (FIGURA 17). As duas proteínas apresentaram diferença estatística bem relevantes, principalmente a PDIA3, cuja expressão estava 2,75 vezes maior com significância de $p < 0,001$. A expressão da PDIA6 apresentou 2,07 vezes maior com $p < 0,01$ (TABELAS 2, 3 e 4).

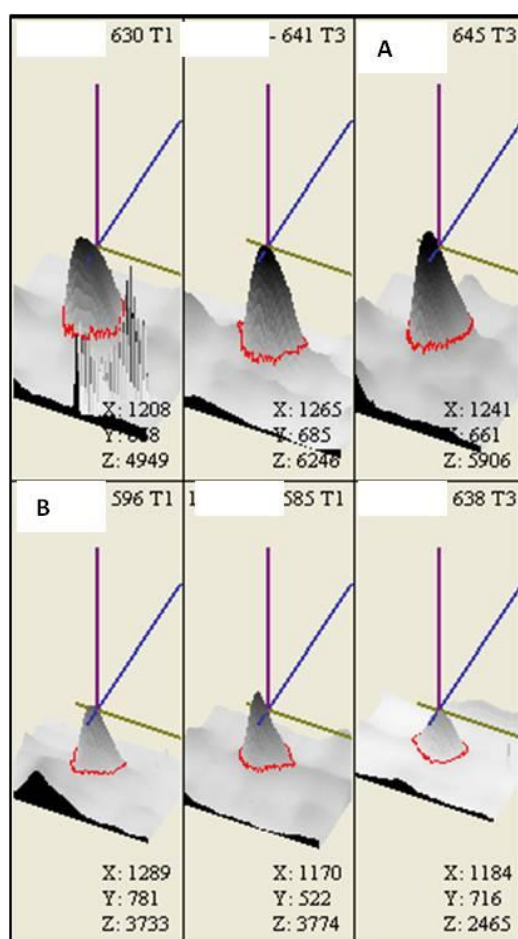


FIGURA 17 – IMAGEM TRIDIMENSIONAL DOS SPOTS DA PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE A3

FONTE- autor (2011)

NOTA – **A** – spot 665 identificado no carcinoma ductal; **B** – spot 2337 identificado no carcinoma lobular. Coordenadas X,Y e Z geradas pelo programa *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0*, dos spots correspondentes a PDIA3 presentes nas seis amostras estudadas.

A proteína dissulfeto isomerase (PDI) é uma enzima que catalisa o rearranjo das pontes dissulfeto, durante o dobramento das proteínas oxidativas no retículo endoplasmático (RE), e também atua como uma chaperona, podendo tanto inibir a agregação das proteínas desnaturadas quanto auxiliar a renaturação dos polipeptídeos. A PDI é membro multifuncional da superfamília tioredoxina, possui multidomínios, se expressa na maioria dos tecidos e órgãos é uma das proteínas

mais abundantes no RE. A chaperona da PDI tem sido descrita como funcionalmente envolvida na renaturação de proteínas, com ou sem pontes de dissulfeto, como a GAPDH, e superexpressa em linhagem celular MCF7-SEL1L. Alterações nos níveis de PDI podem desempenhar um importante papel no dobramento de proteínas e na resposta ao estresse celular (BIANCHI et al., 2005).

Os *spots* 665/2337 encontrados no CD e CL, respectivamente, correspondem a proteína dissulfeto-isomerase A3. Sua identificação apresentou um alto valor referente ao MASCOT score (117 e 194, respectivamente). Foram encontrados valores de MM/ pI observados (57 - 59 kDa/ 6,12 - 6,06) muito próximos dos que eram esperados (57,1 kDa/ 5,98), dados apresentados na FIGURA 18. Dentre estes parâmetros, a identificação da PDIA3 atendeu aos critérios de cobertura de seqüência (25 a 33%), número de peptídeos sobrepostos (13/30 e 14/17) e tolerância de erro (100 e 50 ppm). É codificada pelo gene *PDIA3*, localizado no cromossomo 15 (15q15.3) (Ensembl, 2011).

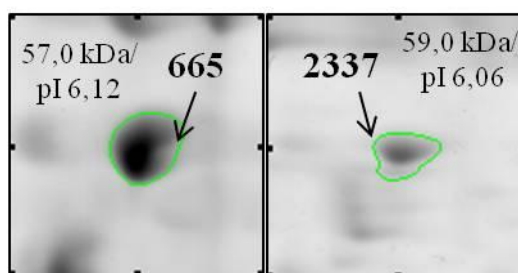


FIGURA 18 – DETALHES DOS SPOTS CORRESPONDENTES A PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE A3

FONTE – Autor (2011)

NOTA - As setas indicam os *spots* identificados em ambos os tumores, com seus respectivos valores de massa molecular (em quilodalton) e ponto isoelétrico.

A PDIA3 está envolvida na resposta celular ao estresse no RE, também conhecida como *unfolded protein response* (UPR), sendo que o nível de expressão dessa proteína aumenta em resposta ao estresse devido à sua função de chaperona. CORAZZARI et al. (2007) analisando o efeito da PDIA3 em linhagem celular de melanoma (A375), correlacionaram esta proteína ao processo de apoptose após indução do estresse no RE. Corroborando com esses dados, Pressinotti et al. (2009) relacionaram a diminuição da atividade das caspases com a baixa regulação da PDIA3 em linhagem celular de câncer de próstata. Estes

resultados sugerem que o aumento de PDIA3 observado nas amostras de CD, pode estar correlacionado ao estresse celular elevado.

O estudo de Pressinotti *et al.*, (2009) investigou a expressão diferencial do gene *PDIA3* entre câncer de próstata de baixa e alta agressividade. Relataram que, na próstata, a PDIA3, além do papel de chaperona, também parece desempenhar um papel como uma proteína pró-apoptótica. Os níveis da PDIA3 significativamente menores no CL comparado ao CD, e os resultados obtidos por Pressinotti *et al.*, (2009), pode indicar que a baixa expressão da PDIA3 possa desempenhar um papel na progressão mais lenta do carcinoma lobular, como o que foi relatado no câncer de próstata. Leys *et al.* (2007) já haviam demonstrado que a falta de expressão desta proteína está associada ao aumento da invasão tumoral e ao estágio avançado no câncer gástrico e, portanto, tem sido proposto ser um potencial marcador de prognóstico negativo.

A última proteína identificada nesse grupo foi a proteína dissulfeto-isomerase A6, codificada pelo gene *PDIA6*, localizado no cromossomo 2 (2p.25.1) (*Ensembl*, 2011). A identificação do *spot* 717 correspondente a esta proteína, expresso no CD, feita através espectrometria de massa em *tandem* (MS/ MS), apresentou uma pequena variação nos valores de MM/ pI observados (51 kDa/ 5,28) em relação aos que eram esperados (48,4 kDa/ 4,95). Dentre os critérios para identificação positiva, o *spot* 2413 correspondente ao 717 expresso no CL, apresentou um MASCOT score (74) superior ao valor mínimo (56), o número de peptídeos sobrepostos (5/7) e a tolerância de erro baixa (50 ppm).

Apesar de essa identificação ter apresentado a cobertura de seqüência de 15%, abaixo da porcentagem mínima de 20% proposta neste trabalho, a identificação foi considerada positiva com base em todos os outros critérios que foram atendidos plenamente. Com base no banco de dados *UniProtKB/ Swiss-Prot* sugere-se que o *spot* 2413 corresponda a isoforma-2 da proteína dissulfeto-isomerase A6, pois apresentou valores de MM/ pI observados (53 kDa/ 5,28) muito próximos dos valores esperados (53,9 kDa/ 5,17) para a isoforma-2.

Todas as proteínas identificadas nesta classe fazem parte da família das proteínas de choque térmico, atuando como chaperonas, protegendo contra o estresse oxidativo, e regulando a dinâmica de vários componentes celulares, tais como o citoesqueleto, filamento e polímeros tubulares compostos por microtúbulos,

microfilamentos e filamentos intermediários (LIANG; MACRAE, 1997). Sendo assim, o aumento nos níveis de expressão das proteínas desta classe, que observamos no tecido mamário das pacientes com carcinoma ductal, poderia ser decorrente de estímulos como o estresse oxidativo e hipóxia, podendo também ser um mecanismo compensatório para suprir o provável *déficit* de ATP, sugerindo um papel importante destas proteínas na tumorigênese.

6.6.4 Regulação da Diferenciação e Proliferação

A proteína identificada envolvida na regulação da diferenciação e proliferação foi o fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF). Segundo o banco de dados do *Ensembl* (2011), esta proteína é codificada pelo gene *SERPINF1* (*serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1*), localizado no cromossomo 17 (17p13.3). A identificação desta proteína feita no *spot* 2420, no CL, diferiu da proteína correspondente no CD (*spot* 723), sendo que este último corresponde à proteína actina (ARP3). Este resultado demonstra que esta proteína considerada diferencialmente expressa no CD não corresponde à mesma proteína expressa nas amostras de CL. Apesar disto, a identificação desta proteína foi mantida neste trabalho por ter atendido aos critérios de *score* (86), número de peptídeos sobrepostos (8/20), tolerância de erro (50 ppm) e a pequena variação dos valores de MM/ pI observados (50,0 kDa/ 5,89) em relação ao esperado (46,4 kDa/ 5,97).

O fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF) pertence à superfamília dos inibidores de serina proteases, mas não é um inibidor desta protease. Estudos de retinopatias e degeneração macular mostram que o PEDF é um dos mais potentes inibidores da angiogênese conhecido e pode ser candidato a supressor de tumor em diversos tipos de câncer (SIMONOVIC; GETTINS; VOLZ, 2001; CAI *et al.*, 2006). Também é um fator neurotrófico que possui funções neuroprotetoras tanto no sistema nervoso central quanto na retina, e é um regulador da diferenciação neuronal em células do retinoblastoma. Análises detalhadas da função estrutural envolvida em possíveis mecanismos de ação da PEDF poderão levar ao desenvolvimento de terapias contra a angiogênese descontrolada (SIMONOVIC; GETTINS; VOLZ, 2001).

Poucos são os estudos que se preocupam em elucidar o significado prognóstico da expressão do PEDF envolvidos na tumorigênese mamária. Cai *et al.* (2006), investigaram o padrão de expressão do PEDF no câncer de mama e o seu efeito *in vitro* em linhagem celular com angiogênese induzida. Observaram que a PEDF é capaz de inibir a formação de túbulos endoteliais que foram induzidos pelo tumor. Os resultados apóiam a hipótese de que a falta de expressão desta proteína pode estar relacionada ao crescimento tumoral e a angiogênese do câncer de mama. Outro estudo *in vivo* mostrou que camundongos sem a expressão do PEDF (*knockout*), tanto na próstata como no pâncreas, desenvolveram hiperplasia com hipervascularização, indicando que a angiogênese tem um papel crítico na manutenção da homeostase tecidual. Estes dados demonstraram que a PEDF pode atuar diretamente nas células tumorais, tornando uma subpopulação de tumores menos agressivos e pouco diferenciados ou suprimindo o crescimento tumoral e/ou inibir a angiogênese induzida pelo tumor levando à supressão tumoral. Além disso, a PEDF pode contribuir para a diferenciação e sobrevivência celular (HALLIN *et al.*, 2004).

6.6.5 Proteína de Ligação

A proteína com função de ligação identificada neste trabalho foi a **proteína Heme-binding** (HEBP1), codificado pelo gene *HEBP1*, localizado no cromossomo 12 (12p13.1). O *spot* 1092, correspondente a esta proteína, apresentou o ponto isoelétrico observado (5,72) bem próximo ao que era esperado (5,71). Entretanto, a massa molecular encontrada (27,0 kDa) teve uma variação relativamente grande quando comparada com o valor teórico (21,1 kDa); diferença acima do padrão de 20% proposto neste trabalho. Apesar disto, esta proteína atendeu aos outros critérios de identificação positiva, apresentando 29% da cobertura da sequência, 5 dos peptídeos obtidos por MS foram pareados, o MASCOT score foi de 72 e a taxa de tolerância ao erro pelo programa foi de 40 ppm (o valor mínimo).

Entretanto, não foi possível identificar a proteína nas amostras de carcinoma lobular presente no *spot* 2865, correspondente ao 1092, que se encontrava fracamente representado no gel e apresentou baixo número de peptídeo obtidos utilizando o espectrômetro de massa (FIGURA 10). Entre as tentativas para

identificá-lo, foi repetida a etapa de excisão do *spot* do gel e realizou-se a concentração dos peptídeos tripticos, entretanto o espectro não obteve identificação positiva quando confrontado com o banco de dados no programa MASCOT.

Neste trabalho foi encontrado aumento da expressão protéica da HEBP1, que foi 2,55 vezes maior no carcinoma ductal quando comparado ao lobular. Em um estudo comparativo foi observada a expressão da HEBP1 significativamente aumentada tanto no tumor primário de mama quanto no linfonodo metastático. Nesta análise os autores verificaram a expressão aumentada 3,19 vezes no tumor com metástase em relação ao sem metástase, e também 3,30 vezes maior no linfonodo metastático em relação ao tumor sem metástase. O papel fisiológico desta proteína relaciona-se à ligação e remoção de moléculas tipo porfirina, cujos níveis aumentados em células tumorais têm sido verificados (BOUCHAL *et al.*, 2009). A maior expressão da proteína HEBP1 também foi detectada em outros trabalhos com linhagem celular de câncer de mama com potencial metastático (SELICHAROVA *et al.*, 2008). Sendo assim, o aumento da expressão nas amostras de CD, poderia ser decorrente da super-regulação da HEBP1 neste subtipo tumoral.

6.6.6 Transporte

Outras proteínas com expressão aumentada encontradas neste trabalho foram as proteínas com função de transporte como a proteína de ligação a Vitamina D (VTDB) e Albumina (ALBU - cinco isoformas).

A proteína de ligação a Vitamina D (VTDB), também conhecida como VDB e DBP, é membro da família das albuminas, juntamente com a albumina sérica e a alfa-fetoproteína. É codificada pelo gene GC localizado no cromossomo 4 (4q13-q13), caracterizado por 42,5 kb de comprimento, 13 exons e pelo menos seis SNPs não sinônimos. A VTDB é uma proteína sérica secretada pelo fígado e apresenta multidomínios. Transporta os metabólitos da vitamina D para diversos locais de ação, tais como o domínio amino-terminal da 25-hidroxi-vitamina D e o carboxi-terminal da actina. Esta proteína tem sido encontrada envolvida na resposta inflamatória e no sistema imunológico (McCULLOUGH; BOSTICK; MAYO, 2009; NONAKA *et al.*, 2010).

A importância da proteína VTDB no desenvolvimento e na carcinogênese da glândula mamária tem sido descrita por muitos trabalhos. Como foi observado, a dosagem do gene GC pode influenciar as mudanças relacionadas à idade em relação a morfologia dos ductos e induzir a ação dos oncogenes na tumorigênese da glândula mámaria *in vivo*. Os modelos animais com câncer de mama demonstram que o tratamento desses animais com a vitamina D pode levar à inibição da progressão ou estabelecer a regressão dos tumores. A ação protetora da vitamina D é mediada através do seu receptor presente nas células mamárias. O citocromo P450 (CYP27B1) converte a vitamina D (25-hidroxivitamina D[25(OH)D]) na sua forma ativa que é o ligante 1,25-dihidroxivitamina D [1,25(OH)D] (DIORIO *et al.*, 2008). Estudos *in vitro* têm demonstrado que o ligante da VTDB está envolvido na sinalização da proliferação, diferenciação e sobrevivência das células epiteliais mamárias normais (WELSH, 2007). De fato, estes receptores vêm sendo descritos como presentes em 80% dos tumores de mama, e expressos em níveis significativamente maiores no tumor do que no tecido mamário normal (PAWLIK *et al.*, 2006).

Dois *spots* foram identificados como proteína de ligação a vitamina D (666 e 2317), em ambos os tumores, cuja principal função é ligar-se à actina e à vitamina D. No nosso estudo foram encontradas diferenças significativas de expressão da proteína VTDB, apresentando níveis 2,68 vezes mais elevados nas amostras de carcinoma ductal em comparação com as amostras de CL. Ambos os *spots* 666 e 2317 apresentaram a MM/pl observado (56 – 55 kDa/ 5,45 – 5,33, respectivamente) bem próximos do valor esperado (54,4 kDa/ 5,40) e também atenderam aos critérios de identificação positiva, apresentando 5 e 19 peptídeos sobrepostos, tolerância mínima de 50 ppm e score de 60 e 163, respectivamente. No entanto, o *spot* 666 apresentou apenas 12% de cobertura da sequência, abaixo do mínimo de 20%. Contudo este dado foi somado a este trabalho, por ter atendido aos outros critérios para considerar positiva a identificação. De acordo com o banco de dados *UniProtKB/ Swiss-Prot*, duas isoformas originadas por *splicing* alternativo desta proteína já foram relatadas.

O fato relatado neste trabalho, da proteína de ligação a vitamina D ter sido encontrada com expressão elevada no carcinoma ductal, foi condizente com os dados prévios da literatura. Pawlik *et al.* (2006) analisaram a expressão diferencial

do carcinoma mamário invasivo entre amostras com o tumor e mamas livre da doença, através de marcação de afinidade por isótopo e por *western blot*, e confirmaram a superexpressão da VTDB nas amostras tumorais. A desregulação da sinalização da vitamina D pode conduzir a proliferação de células indiferenciadas, o que pode predispor a transformação (McCULLOUGH; BOSTICK; MAYO, 2009). Em um estudo *in vitro* com linhagem celular de câncer pancreático - BxPC-3 e outro *in vivo* com células de carcinoma hepatocelular (HCC) xenotransplantadas em camundongos, foi identificado o fator de ativação de macrófagos derivado da proteína VTDB, envolvido na inibição da angiogênese e da progressão tumoral (KISKER *et al.*, 2003; NONAKA *et al.*, 2010).

Finalmente, pode-se observar que ambos, CD e CL, apresentaram expressão da albumina, indicando a presença desta proteína no tecido tumoral mamário, como já foi relatado na literatura (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2007; CORTESI *et al.*, 2009). Outros estudos demonstram que o perfil proteômico do tecido não-tumoral adjacente revela quase que exclusivamente a presença de proteínas do soro e sangue, consistindo principalmente de albumina e imunoglobulinas (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2008).

Foram encontradas seis isoformas da albumina sérica, identificadas por seis *spots* em ambos os tumores (*spots ID* 756, 2456, 2302, 1030, 1075 e 720), localizadas em diversas posições no gel, que apresentaram variação significativa da massa observada em relação ao valor esperado, como pode ser visualizado no APÊNDICE 02. Pucci-minafra *et al.*, (2007) também observaram várias isoformas da albumina no tecido mamário tumoral. De acordo com o banco de dados *UniProtKB/Swiss-Prot*, já foram relatados duas isoformas desta proteína resultante do *splicing* alternativo.

Neste trabalho encontramos dificuldades na identificação protéica devido à existência de proteínas extremamente abundantes, tais como a albumina, uma característica do tecido mamário. O tamanho dos *spots* destas proteínas representa um problema, uma vez que dificultam a identificação por espectrometria de massas dos peptídeos menos abundantes, pois estes não conseguem atingir uma alta cobertura de sequência para ser considerada identificação positiva.

Muitos trabalhos usam métodos de precipitação, centrifugação, cromatografia por afinidade e kits comerciais para remoção tanto da albumina como

das imunoglobulinas (FOUNTOULAKIS *et al.*, 2004; COLANTONIO *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2005; ZOLOTARJOVA *et al.*, 2005). Entretanto, métodos de imunodepleção têm capacidade limitada de ligação, e restringem o tamanho da amostra, além dessa depleção não ser completa. Portanto, não é compatível a remoção de proteínas do plasma em amostras complexas, como o tecido mamário. É importante ressaltar, que a remoção da albumina também pode levar à remoção de pelo menos 35 proteínas ligadas a ela, tais como citocinas e hormônios, devido a sua função fisiológica de carreadora (GRANGER *et al.*, 2005; SUTTON *et al.*, 2010). Além disso, pode influenciar na reprodutibilidade, e por todos estes motivos optamos por não utilizar nenhum método de depleção para remover as proteínas séricas nas amostras do tecido mamário.

7. CONCLUSÃO

A primeira etapa deste projeto, ao realizar um estudo comparativo entre os carcinomas ductais (CD) e lobulares (CL), foi desenvolver um protocolo que permitisse boa resolução e reprodutibilidade de géis bidimensionais, especialmente para o CL, que apresentou um comportamento bastante diverso do CD, já anteriormente padronizado no Laboratório. Este trabalho estabeleceu com sucesso um protocolo de análise.

A análise comparativa do proteoma realizado por eletroforese bidimensional possibilitou a identificação de 26 proteínas diferencialmente expressas entre pacientes com CD e CL.

Observamos diferenças na expressão de proteínas envolvidas numa série de processos biológicos, como na apoptose, resposta ao estresse, organização do citoesqueleto, diferenciação, proliferação, progressão, angiogênese e na regulação da divisão celular, que podem desempenhar um papel importante nas propriedades tipo-específico de cada tumor. A maioria das proteínas apresentou níveis mais altos no tecido mamário com CD do que no CL.

Nossos dados reforçam a diferença de expressão de algumas proteínas relatadas em trabalhos anteriores, além de apontar diferenças relevantes entre os dois subtipos tumorais, que devem ser confirmadas em amostras individuais. Como por exemplo, a baixa regulação da proteína de ligação a vitamina D, tropomiosina cadeia alfa-3, triose-fosfato isomerase e a endoplasmina, encontradas no carcinoma lobular. Conseqüentemente, o CL difere do CD não somente nas características clínicas e histológicas, mas também no padrão de expressão protéica, fornecendo evidências complexas da inter-relação entre os subtipos histológicos. Os achados protéicos diferenciais tanto do CD quanto do CL podem trazer importantes aplicações clínicas como potenciais biomarcadores, inclusive para terapias direcionadas. No entanto mais estudos são necessários para compreender as diferenças observadas neste estudo, quanto a fornecer informações consistentes sobre a correlação destas proteínas com o diagnóstico, tratamento e prognóstico de cada subtipo histológico.

8. PERSPECTIVAS

A utilização de técnicas de análise proteômica representa um recurso em potencial para o diagnóstico de biomarcadores que poderão ser identificados no soro das pacientes, auxiliando assim no diagnóstico mais precoce. Além disso, a identificação protéica diferencial visa contribuir na biologia molecular do câncer de mama, podendo também auxiliar na descoberta de melhores alvos protéicos e no tratamento clínico direcionado, de acordo com as características biológicas do tumor.

Embora o intuito desse trabalho fosse identificar alterações de marcadores moleculares consistentes entre os subtipos histológicos, somente as informações sobre quais proteínas estão diferencialmente expressas não nos permitem, na prática, estabelecer biomarcadores moleculares, devido à complexidade do tecido mamário. Com isso, sugerimos a necessidade de desenvolver trabalhos futuros que possam fornecer informações detalhadas sobre as proteínas diferentes, observadas entre os tumores neste trabalho.

Para ter a complementação dos nossos resultados e a fim de identificar biomarcadores que possam auxiliar no tratamento diferencial, é importante o emprego de outras metodologias, como a análise do transcriptoma ou a utilização de anticorpos, com o intuito de validar e fundamentar a expressão das proteínas diferenciais observadas neste estudo. Estas análises auxiliarão na compreensão mais integrada das diferenças fisiológicas e moleculares dos diferentes fenótipos do câncer de mama. Com isso, talvez possamos investigar os perfis biológicos capazes de distinguir os dois subtipos tumorais e explicar as diferenças encontradas na clínica.

Apesar de toda a complexidade em relação a estabelecer biomarcadores consistentes, acreditamos que ao ter gerado estes dados, contribuímos para um melhor conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos nas diferenças inerentes ao desenvolvimento de cada subtipo histológico, e desta forma esperamos ter apontado proteínas de interesse para futuras investigações.

REFERÊNCIAS

ALAIYA, A.; AL-MOHANNA, M.; LINDER, S. Clinical Cancer Proteomics: Promises and Pitfalls. **Journal of Proteome Research**, v. 4, p. 1213-1222, 2005.

ALLDRIDGE, L.; METODIEVA, G.; GREENWOOD, C.; AL-JANABI, K.; THWAITES, L.; SAUVEN, P.; METODIEV, M. Proteome profiling of breast tumors by gel electrophoresis and nanoscale electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 4, p. 1458-1469, 2008.

ARPINO, G.; BARDOU, V.J.; CLARK, G.M.; ELLEDGE, R.M. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumour characteristics and clinical outcome. **Breast Cancer Research**, v. 6, p. R149-R156, 2004.

BALMAIN, A.; GRAY, J.; PONDER, B. The genetics and genomics of cancer. **Nature Genetics Supplement**, v. 33, p. 238-247, 2003.

BARROS, A.C.S.D.; BARBOSA, E.M.; GEBRIM, L.H.; ANELLI, A.; FIGUEIRA FILHO, A.; DEL GIGLIO A.; GUSMÃO, C.B.; PELIZON, C.; MARTELLA, E.; MOTTA, E.; FERNANDES, J.L.; PINOTTI, J.A.; RIBEIRO, L.C.B.; SANTOS, M.O.; ARAÚJO, M.B.; ABREU e LIMA, M.C.; MOURÃO NETO, M.; YAMAGUCHI, N.H.; CARMO, P.A.O.; MARQUE, R. Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama. Sociedade Brasileira de Mastologia, Sociedade Brasileira de Cancerologia, Sociedade Brasileira de Patologia, Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, 2001.

BAYLIN, S.B.; STELLER, M.; ROUNTREE, M.R.; BACHMAN, E.K.; SCHUEBEL, K.; HERMAN, J.G. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. **Human Molecular Genetics**, v.10, p. 687-692, 2001.

BARTKOWIAK, K.; EFFENBERGER, K.E.; HARDER, S.; ANDREAS, A.; BUCK, F.; KATALINIC, P.J.; PANTEL, K.; BRANDT, B.H. Discovery of a Novel Unfolded Protein Response Phenotype of Cancer Stem/Progenitor Cells from the Bone Marrow of Breast Cancer Patients. **Journal Proteome Research**, v. 9, p. 3158–3168, jan., 2010.

BERKELMAN, T.; STENSTED, T. **2-D electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods**. Edition AC (80-6429-60). Uppsala, Sweden: Amersham Biosciences Inc., 1998. Manual do fabricante. 100p.

BERTUCCI, F.; BIRNBAUM, D.; GONÇALVES, A. Proteomics of breast cancer: principles and potential clinical applications. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, p. 1772-1786, 2006.

BETANCOURT, A.M.; MOBLEYB, J.A.; RUSSOD, J.; LAMARTINIERE, C.A. Proteomic analysis in mammary glands of rat offspring exposed in utero to bisphenol A. **Journal of proteomics**, v. 73, p. 1241 – 1253, 2010.

BIANCHI, L.; CANTON, C.; BINI, L.; ORLANDI, R.; MÉNARD, S.; ARMINI, A.; CATTANEO, M.; PALLINI, V.; BERNARDI, L.R.; BIUNNO, I. Protein profile changes in the human breast cancer cell line MCF-7 in response to SEL1L gene induction. **Proteomic**, v. 5, p. 2433–2442, fev., 2005.

BIÈCHE, I.; CHAMPEME, M. H.; MATIFAS, F.; CROPP, C. R.; CALAHAN, R.; LIDEREAU, R. Two distinct regions involved in 1p deletion in human primary breast cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 53, p. 1950-1994, 1993.

BIGLIA, N.; MARIANI, L.; SGRO, L.; MININANNI, P.; MOGGIO, G.; SISMONDI, P. Increased incidence of lobular breast cancer in women treated with hormone replacement therapy: implications for diagnosis, surgical and medical treatment. **Endocrine-Related Cancer**, v. 14, p. 549-567, 2007.

BIRNBAUM, D.; BERTUCCI, F.; GINESTIER, C.; TAGETT, R.; JACQUEMIER, J.; CHARAFE-JAUFFRET, E. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? (review). **International Journal of Oncology**, Athens, v. 25, p. 249-258, 2004.

BISCH, P. M. Proteômica. In: LUÍS MIR. (Org.). **Genômica**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu. v. 1, 2004. p. 139-162.

BHATTACHARYA, B.; PRASAD, G. L.; VALVERIUS, E M.; SALOMON, D. S.; COOPER, H. L. Tropomyosins of human mammary epithelial cells: consistent defects of expression in mammary carcinoma cell lines. **Cancer Research**, v. 50, p. 2105–2112, 1990.

BOECKER W, BUERGER H. Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineage in the human adult breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. **Cell proliferation**, Oxford, v. 36, p. 73-84, 2003.

BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G.; ROCHA, A. **Bogliolo patologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.1472.

BOUCHAL, P.; ROUMELIOTIS, T.; HRSTKA, R.; NENUTIL, R.; VOJTESEK, B.; GARBIS, S.D. Biomarker Discovery in Low-Grade Breast Cancer Using Isobaric Stable Isotope Tags and Two-Dimensional Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (iTRAQ-2DLC MS/MS) Based Quantitative Proteomic Analysis. **Journal of Proteome Research**, v. 8 (1), p. 362–373, 2009.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAY, F.; McCARRON, P.; PARKIN, D.M. The changing global patterns of female breast cancer and mortality. **Breast Cancer Research**, v. 6, p. 229-239, 2004.

CAGNEY, G.; AMIRI, S.; PREMAWARADENA, T.; LINDO, M.; EMILI, A. In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. **Proteome Science**, v.1, p.1-15, 2003.

CAHILL, D.J.; NORDHOFF, E.; O'BRIEN, J.; KLOSE, J.; EICKHOFF, H.; LEHRACH, H. Bridging genomics and proteomics. In: PENNINGTON, S.R.; DUNN, M.J (Ed.). **Proteomics from protein sequence to function**. BIOS Scientific Publishers Limited, 2001. p.1-22.

CAI, J.; PARR, C.; WATKINS, G.; JIANG, W.G.; Boulton, M. Decreased Pigment Epithelium-Derived Factor Expression in Human Breast Cancer Progression. **Clinical Cancer Research**, v. 12, p. 3510-3517, jun., 2006.

CANTÚ, M.D.; CARRILHO, E.; WULFF, N.A.; PALMA, M.S. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.

CASH, F. Review: Characterization of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 372, p. 121-145, 1998.

CASSIMERIS, L. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, n. 1, p. 18-24, 2002.

CAO, S.; HUI HO, G.; LIN, V.C.L. Tetratricopeptide repeat domain 9A is an interacting protein for tropomyosin Tm5NM-1. **Biomedcentral Cancer**, v. 8, n. 231, p. 1-11, 2008.

CHANG, J.; REMMEN, H.V.; CORNELL, J.; RICHARDSON, A.; WARD, W, F. Comparative proteomics: characterization of a two-dimensional gel electrophoresis system to study the effect of aging on mitochondrial proteins. **Mech. Ageing Dev.**, v.124, p.33-41, 2003.

CHAVES, D.F.S. **ANÁLISE PROTEÔMICA DAS ESTIRPES SELVAGEM, *ntrC*- e *nifA*- DE *Herbaspirillum seropedicae***. 108 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

CHEN, Y.Y.; LIN, S.Y.; YEH, Y.Y.; HSIAO, H.H.; WU, C.Y.; CHEN, S.T.; WANG, A.H. A Modified Protein Precipitation Procedure For Efficient Removal Of Albumin From Serum. **Electrophoresis**. v. 26, p. 2117-27, 2005.

CLARKE, M.F.; FULLER, M. Stem cells and cancer: two faces of eve. **Cell**, Cambridge, v. 124, n. 6, p. 1111- 1115, 2006.

COLANTONIO, D.A; DUNKINSON, C.; BOVENKAMP, D.E.; EYK, J.E.V. Effective removal of albumin from serum. **Proteomics**. v. 5, p. 3831–3835, 2005.

CORAZZARI, M.; LOVAT, P.E.; ARMSTRONG, J.L.; FIMIA, G.M.; HILL, D.S.; BIRCH-MACHIN, M.; REDFERN, C.P.; PIACENTINI, M. Targeting homeostatic mechanisms of endoplasmic reticulum stress to increase susceptibility of cancer cells to fenretinide-induced apoptosis: the role of stress proteins ERdj5 and ERp57. **British Journal of Cancer**, v. 96, p. 1062-1071, 2007.

CORTESI, L.; BARCHETTI, A.; DE MATTEIS, E.; ROSSI, E.; CASA, L.D.; MARCHESELLI, L.; TAZZIOLI, G.; LAZZARETTI, M.G.; FICARRA, G.; FEDERICO, M.; IANNONE, A. Identification of Protein Clusters Predictive of Response to Chemotherapy in Breast Cancer Patients. **Journal of Proteome Research**, v.8, p. 4916–4933, 2009.

CUZICK, J. Assessing risk for breast cancer. **Breast Cancer Research**, London, v. 10, n. 4, dez. 2008.

DIMRI, G.; BAND, H.; BAND, V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. **Breast Cancer Res**, v. 7, n. 4, p.171-179, 2005.

DIORIO, C.; SINOTTE, M.; BRISSON, J.; BERUBE, S.; POLLAK, M. Vitamin D Pathway Polymorphisms in Relation to Mammographic Breast Density. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention**, v.17, p.2505-2508, set., 2008.

DOMAGALA, W.; MARKIEWSKI, M.; KUBIAK, R.; BARTKOWIAK, J.; OSBORN, M. Immunohistochemical profile of invasive lobular carcinoma of the breast: predominantly vimentin and p53 protein negative, cathepsin D and oestrogen receptor positive. **Virchows Arch A Pathology Anatomy Histopathology**, v. 423, p. 497-502, 1993.

DOMAGALA, W.; MARKIEWSKI, M.; HAREZGA, B.; DUKOWICZ, A.; Osborn, M. Prognostic Significance of Tumor Cell Proliferation Rate as Determined by the MIB-1 Antibody in Breast Carcinoma: Its Relationship with Vimentin and p53 Protein I. **Clinical Cancer Research**, v. 2, p. 147-154, jan., 1996.

DOZIER, J.H.; HISER, L.; DAVIS, J.A.; THOMAS, N.S.; TUCCI, M.A.; BENGHUZZI, H.A.; FRANKFURTER, A.; CORREIA, J.J.; LOBERT, S. β class II tubulin predominates in normal and tumor breast tissues. **Breast Cancer Research**, v. 5, n. 5, p. R157-R169, 2003.

DUPONT, A.; CORSEAU, D.; DEKEYZER, O.; DROBECQ, H.; GUIHOT, A. L.; SUSEN, S.; VINCENTELLI, A.; AMOUYEL, P.; JUDE, B.; PINET, F. The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells. **Proteomics**, v. 5, p. 585-596, 2005.

DUMITRESCU, R.; COTARLA, I. Understanding breast cancer risk - were do we stand in 2005?. **Journal Cell Molecular Medic**, v. 9, n. 1, p. 208-221, 2005.

EINSENBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 4, p. 377-88, 2001.

ELLSWORTH, R.E.; ELLSWORTH, D.L.; LOVE, B.; PATNEY, H.L.; HOFFMAN, L.R.; KANE, J.; HOOKE, J.A.; SHRIVER, C.D. Correlation of Levels and Patterns of Genomic Instability With Histological Grading of DCIS. **Annals of Surgical Oncology**, v.14, n. 11, p. 3070-3077, 2007.

EL KHOURY, M.; CHEREL, P.; BECETTE, V. Unusual soft-tissue metastasis of an invasive lobular carcinoma mimicking fasciitis. **American journal of roentgenology**, Springfield, v. 182, p. 745–747, 2004.

ESTELLER, M.; CORN, P.G.; BAYLIN, S.B.; HERMAN, J.G. A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Research**, v. 61, p. 3225-3229, 2001.

FARMER, H.; McCABE, N.; LORD, C.J.; *et al.* Targeting the DNA repair effect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 917-921, 2005.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, Cambridge, v. 61, p. 759-767, 1990.

FEINBERG, A.P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of the human cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p. 21-33, 2006.

FOUNTOULAKIS, M.; JURANVILLE, J.F.; JIANG, L.; AVILA, D.; RÖDER, D.; JAKOB, P.; BERNDT, P.; EVERS, S.; LANGEN, H. Depletion of the high abundance plasma proteins. **Amino Acids**, v. 27, p. 249–259, 2004.

FRANZEN, B.; LINDER, S.; URYU, K.; ALAIYAL, A.A.; HIRANO, T.; KATO, H.; AUER, G. Expression of tropomyosin isoforms in benign and malignant human breast lesions. **British Journal of Cancer**, v.73, p. 909-913, 1996.

GALLETTA, B. J.; CHUANG, D. Y.; COOPER, J. A. Distinct roles for Arp2/3 regulators in actin assembly and endocytosis. **PLoS Biology**, v. 6, n. 1, p. 72-85, 2008.

GE HEALTHCARE – HANDBOOK. **2-D Electrophoresis: Principles and Methods**. Suécia: Ed. Elanders Tofters, p. 162, 2004.

GEVAERT, K.; VANDEKERCKHOVE, J. Protein identification methods in proteomics. **Electrophoresis**, v. 21, n. 6, p. 1145-54, 2000.

GRANGER, J.; SIDDIQUI, J.; COPELAND, S.; REMICK, D. Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. **Proteomics**, v. 5, p. 4713–4718, 2005.

GORG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, n. 6, p. 1037-1053, 2000.

GORG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685, 2004.

GONÇALVES, A.T.C.; JOBIN, P.F.C; VANACOR, R.; NUNES, L.N.; ALBUQUERQUE, I.M.; BOZZETTI, M.C. Câncer de mama: mortalidade crescente na Região Sul do Brasil entre 1980 e 2002. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, p. 1785-1790, 2007.

GORG, A.; OBERMAIER, C.; BOGUTH, G.; HARDER, A.; SCHEIBE, B.; WILDGRUBER, R.; WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, n. 6, p. 1037-1053, 2000.

GORG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685, 2004.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p.39-63, 2002.

HABER, D.A.; FEARON, E.R. The promise of cancer genetics. **Lancet**, v. 351, p. 1-8, 1998.

HALLIN, S.; WIKSTROM, P.; RUDOLFSSON, S.H.; STATIN, P.; DOLL, J.A.; CRAWFORD, S.E.; BERGH, A. Decreased pigment epithelium-derived factor is associated with metastatic phenotype in human and rat prostate tumors. **Cancer Research**, v. 64, p. 5664-71, 2004.

HESKETH, A.R; CHANDRA, G.; SHAW, A.D.; ROWLAND, J.J.; KELL, D.B.; BIBB, M.J.; CHATER, K.F. Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicor*. **Molecular Microbiology**, v.46, p.917-932, 2002.

HANBY, A.M.; HUGHES, T.A. *In situ* and invasive lobular neoplasia of the breast. **Histopathology**, v. 52, p. 58-66, 2008.

HANKINSON, S.E.; COLDITZ, G.A.; WILLETT, W.C. Towards an integrated model for breast cancer etiology-the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. **Breast Cancer Research**, v. 6, p. 213–218, 2004.

HARTWELL, L.H.; SZANKASI, P.; ROBERTS, C.J.; MURRAY, A.W.; FRIEND, S.H. Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. **Science**, v. 278, p. 1064-1068, 1997.

HENRY, N. L.; HAYES, D. F. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring and treatment of primary and metastatic breast cancer. **The Oncologist**, v. 11, p. 541-552, 2006.

HERBERT, B.R.; LARRY, J.L.; PACKER, N.H.; GOOLEY, A.A.; PEDERSON, S.K. What place for polyacrilamide in proteomics? **Trends Biotech.**, 19, 2001.

HEYWANG, S.H.; SCHREER, I.D.; ERSHAW, D.D. Diagnostic breast imaging. Stuttgart New York: **Thieme**, 1997.

HINCK, L. The Versatile Roles of “Axon Guidance” Cues in Tissue Morphogenesis. **Developmental cell**, Cambridge, v. 7(6), p. 783-93, 2004.

HONDERMARCK, H.; TASTET, C.; YAZIDI-BELKOURA, I. E.; TOILLON, R. A.; BOURHIS, X. L. Proteomics of breast cancer: The quest for markers and therapeutic targets. **Journal of proteome research**, v. 7, n. 4, p. 1403-1411, 2008.

IKEDA, K.; INOUE, S. Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. **Archives of Histology and Cytology**, v. 67, p. 435-442, 2004.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Controle do câncer de mama. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/publicacoes/Consensointegra.pdf>>. Acesso em: janeiro de 2011.

INCA: Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: agosto de 2010.

JIANG, L.; HEA, L.; FOUNTOULAKIS, M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, p. 317–320, 2004.

JUNGBLUT, P.R. Proteome analysis of bacterial pathogens. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 831-840, 2001.

KAHLENBORN, C.; MODUGNO, F.; POTTER, D.M.; SEVERS, W.B. Oral contraceptive use as a risk factor for premenopausal breast cancer: a meta-analysis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 81, n. 10, p. 1290-1302, 2006.

KEY, T.J. Serum oestradiol and breast cancer risk. **Endocrine Related Câncer**, Oxford, v. 6, p. 175-180, 1999.

KISKER, O.; ONIZUKA, S.; BECKER, C.M.; FANNON, M.; FLYNN, E.; AMATO, R.; ZETTER, B.; FOLKMA, J.; RAY, R.; SWAMYYY, N.; SHEPHERD, S.P. Vitamin D binding protein-macrophage activating factor (DBP-maf) inhibits angiogenesis and tumor growth in mice. **Neoplasia**, v. 5, p. 32-40, jan., 2003.

KORKOLA, J.E.; DEVRIES, S.; FRIDLYAND, J.; HWANG, E.S.; ESTEP, A.L.H.; CHEN, Y.Y.; CHEW, K.L.; DAIRKEE, S.H.; JENSEN, R.M.; WALDMAN, F.M. Differentiation of Lobular *versus* Ductal Breast Carcinomas by Expression Microarray Analysis. **Cancer research**, v. 63, p. 7167–7175, nov., 2003

KULAWIEC, M.; ARNOUK, H.; DESOUKI, M.M.; KAZIM, L.; STILL, I.; SINGH, K.K. Proteomic Analysis of Mitochondria-to-Nucleus Retrograde Response in Human Cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 5, p. 967-975, agos., 2006.

KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 68, p. 820 – 823, 1971.

LAEMMLI, U.K. SDS-PAGE. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAGERROS, Y.T.; HSIEH, S.F.; HSIEH, C.C. Physical activity in adolescence and young adulthood and breast cancer risk: a quantitative review. **European Journal Cancer Prevention**, v. 13, p. 5–12, 2004.

LEYS, C.M.; NOMURA, S.; LAFLEUR, B.J.; FERRONE, S.; KAMINISHI, M.; MONTGOMERY, E.; GOLDENRING, J.R. Expression and prognostic significance of prothymosin- α and ERp57 in human gastric cancer. **Surgery**, v. 141, p. 41-50, 2007.

LI, C.I.; DALING, J.R.; MALONE, K.E.; BERNSTEIN, L.; MARCHBANKS, P.A.; LIFF, J.M.; STROM, B.L.; SIMON, M.S.; PRESS, M.F.; MCDONALD, J.A.; URSIN, G.; BURKMAN, R.T.; DEAPEN, D.; SPIRTAS, R. Relationship between Established Breast Cancer Risk Factors and Risk of Seven Different Histologic Types of Invasive Breast Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.15, n.5, p. 946–54, mai., 2006.

LIANG, P.; MACRAE, T.H. Molecular chaperones and the cytoskeleton. **Journal of Cell Science**, v.110, p.1431-1440, 1997.

LICHTENFELS, R.; KELLNER, R.; ATKINS, D.; BUKUR, J.; ACKERMANN, A.; BECK, J.; BRENNER, W.; MELCHIOR, S.; SELIGER, B. Identification of metabolic enzymes in renal cell carcinoma utilizing PROTEOMEX analyses. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1646, p.21–31, 2003.

LIEBLER, D. C. Introduction to proteomics: tools for the new biology. **Humana Press**, p. 198, 2002.

LOURO, I. D.; LLERENA JR., J. C.; VIEIRA DE MELO, M. S.; ASHTON-PROLLA, P.; CONFORTI-FROES, N. **Genética molecular do câncer**, 2 ed., São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

MANN, M.; HENDRICKSON, R.C.; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 437-73, 2001.

MARVIN, L.F.; ROBERTS, M.A.; FAY, L.B. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 337, p. 11-21, 2003.

MASTRACCI, T.L.; BOULOS, F.I.; ANDRULIS, I.L.; LAM, W.L. Genomics and premalignant breast lesions: clues to the development and progression of lobular breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 6, 2007.

McCABE, N.; TURNER, N.C.; LORD, C.J.; KLUZEK, K.; BIAŁKOWSKA, A.; SWIFT, S.; GIAVARA, S.; O'CONNOR, M.J.; TUTT, A.N.; ZDZIENICKA, M.Z.;

SMITH, G.C.M.; Ashworth, A. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly (ADP-ribose) polymerase inhibition. **Cancer Research**, v. 66, n. 16, p. 8109-8115, 2006.

McCULLOUGH, M.L.; BOSTICK, R.M.; MAYO, T.L. Vitamin D Gene Pathway Polymorphisms and Risk of Colorectal, Breast, and Prostate Cancer. **Annual Review of Nutrition**, v. 29, p. 111–32, 2009.

McEVOY, S.P.; INGRAM, D.M.; BYRNE, M.J.; JOSEPH, D.J.; DEWAR, J.; TROTTER, J. et al. Breast cancer in Western Australia: clinical practice and clinical guidelines. **Medical Journal**, v. 181, p. 305-309, 2004.

MCPHERSON, K.; STEEL, C.M.; DIXON, J.M. ABC of breast diseases. Breast cancer - epidemiology, risk factors and genetics. **British Medical Journal**, London, v. 321, p. 624-628, set., 2000.

MERSIN, H; YILDIRIM, E; GULBEN, K; BERBEROGLU, U. Is invasive lobular carcinoma different from invasive ductal carcinoma?. **European Journal Surgical Oncology**, v. 29, p. 390–5, 2003.

MOMPARLER, R.L. Cancer epigenetics. **Oncogene**, v. 22, p. 6479-6483, 2003.

MULLAN, P.B.; MILLIKAN, R.C. Molecular subtyping of breast cancer: opportunities for new therapeutic approaches. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Boston, 2007.

NAROD, S.A.; FOULKES, W.D. BRCA1 and BRCA2. **Nature Reviews**, v. 4, p. 665-676, 2004.

NONAKA, K.; ONIZUKA, S.; ISHIBASHI, H.; UTO, Y.; HORI, H.; NAKAYAMA, T.; MATSUURA, N.; KANEMATSU, T.; FUJIOKA, H. Vitamin D Binding Protein-Macrophage Activating Factor Inhibits HCC in SCID Mice. **Journal of Surgical Research**, v. 12, p 1-7, 2010.

NOWAK, D., SKWAREK-MARUSZEWSKA, A., ZEMANEK-ZBOCH, M., MALICKA-BŁASZKIEWICZ, M. Beta-actin in human colon adenocarcinoma cell lines with different metastatic potential. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 2, p. 461–468, 2005.

NUSSBAUM, R.L.; MCINNES, R.R.; WILLARD, H.F. **THOMPSON & THOMPSON: Genética Médica**. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

OAKLEY, B. R.; An abundance of tubulins. **Trends Cell Biology**, v. 10, n. 12, p. 537-542, 2000.

OLDENBURG, R.A.; MEIJERS-HEIJBOER, H.; CORNELISSE, C.J.; DEVILEE, P. Genetic susceptibility for breast cancer: How many more genes to be found? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 63, p. 125-149, 2007.

OLIVEIRA, M. A.; SANTOS, G. C.; KANAMURA, C. T. *et al.* Imunoexpressão da proteína Her-2 em punção aspirativa com agulha fina de carcinoma de mama: correlação com os achados da peça cirúrgica. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, n.1, p. 23-28, fev. 2003.

OLIVEIRA, M.M.C; TORRESAN, C.; OLIVEIRA, S.F.V; TORREZAN, G.T.; ABUAZAR, C.S.;LIMA, R.S; URBAN, C.A.; CAVALLI, R.L.; RIBEIRO, E.M.S.F.;CAVALLI,I.J. Epidemiologia do câncer de mama em pacientes do Sul do Brasil. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 63, março, 2009.

PAGE, D.L.; ANDERSON, T.J. **Diagnostic histopathology of the breast cancer**. 1 ed. New York: Churchill Livingstone, 1987.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, p. 837-846, 2000.

PARKIN, M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global Cancer Statistics, 2002. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, p. 74-108, 2005.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. I.; DEVESA, S. S. Cancer burden in the year 2000. **The global picture European journal of cancer**, Oxford, v. 37, p. 4-66, 2001.

PAWLIK, T.M.; HAWKE, D.H.; LIU, Y.; KRISHNAMURTHY, S.; FRITSCH, H.; HUNT, K.K.; KUERER, H.M. Proteomic analysis of nipple aspirate fluid from women with early-stage breast cancer using isotope-coded affinity tags and tandem mass spectrometry reveals differential expression of vitamin D binding protein. **Biomedcentral Cancer**, v. 6, p. 68, out., 2006.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of clinical Investigation**, New Haven, v. 117, n.11, p. 3155-3163, nov. 2007.

PRESSINOTTI, N.C.; KLOCKER, H.; SCHÄFER, G.; DUC LUU, V.; RUSCHHAUPT, M.; KUNER, R.; STEINER, E.; POUSTKA, A.; BARTSCH, G.; SÜLTMANN, H. Differential expression of apoptotic genes *PDIA3* and *MAP3K5* distinguishes between low- and high-risk prostate cancer. **Molecular Cancer**, v. 8, p. 130. dez., 2009.

PUCCI-MINAFRA, I. P.; CANCEMI, P.; FONTANA, S.; MINAFRA, L.; FEO, S.; BECCHI, M.; FREYRIA, A. M.; MINAFRA, S. Expanding the protein catalogue in the proteome reference map of human breast cancer cells. **Proteomics**, v. 6, p. 2609-2625, 2006.

PUCCI-MINAFRA, I.; CANCEMI, P.; MARABETI, M.R.; ALBANESE, N.N.; DI CARA, G.; TAORMINA, P.; MARRAZZO, A. Proteomic profiling of 13 paired ductal infiltrating breast carcinomas and non-tumoral adjacent counterparts. **Proteomics - Clinical Application**, v. 1, p. 118–129, 2007.

PUCCI-MINAFRA, I.P.; CANCEMI, P.; ALBANESE, N.N.; CARA, G.; MARABETI, M.R.; MARRAZZO, A.; MINAFRA, S. New Protein Clustering of Breast Cancer Tissue Proteomics Using Actin Content as a Cellularity Indicator. **Journal of Proteome Research**, v. 7, p. 1412–1418, 2008.

QAYYUM, A.; BIRDWELL, R.L.; DANIEL, B.L.; NOWELS, K.W.; JEFFREY, S.S.; AGOSTON, T.A.; HERFKENS, R.J. MR imaging features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: Histopathologic correlation. **American Journal Roentgenology**, v. 178, p. 1227-1232, 2002.

QUADRONI, M.; JAMES, P. Enhancing high-throughput proteome analysis: the impact of stable isotope labeling. In: PENNINGTON, S.R.; DUNN, M.J (Ed.). **Proteomics from protein sequence to function**. BIOS Scientific Publishers Limited, 2001. p.151-169.

RADICE, D.; REDAELLI, A. Breast cancer management: quality-of-life and cost considerations. **Pharmacoeconomics**, v. 21, n. 6, p. 383-396, 2003.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **Canadian Medical Association journal**, Ottawa, v. 174, n. 3, p. 10.1503, 2006.

ROULEAU, M.; PATEL, A.; HENDZEL, M.J.; KAUFMANN, S.H.; POIRIER, G.G. PARP inhibition: PARP1 and beyond. **Nature Review: Cancer**, v. 10, p. 293-301, abril, 2010.

SANTEN, R.J.; ALLRED, D.C.; ARDOIN, S.P.; ARCHER, D.F.; BOYD, N.; BRAUNSTEIN, G.D.; MARTIN, H.L.; PINKERTON, J.V.; RUBINOW, D.R.; TEEDE, H.; THIBOUTOT, D.M.; UTIAN JARJOUR, W.H.; KARAS, R.H.; KLEEREKOPER, M.; LOBO, R.A.; MANSON, J.E.; MARSDEN, J.; MARTIN, K.A.; BURGER, H.G.; COLDITZ, G.A.; DAVIS, S.R.; GAMBACCIANI, M.; GOWER, B.A.; HENDERSON, V.W.; WAEL N. Postmenopausal Hormone Therapy: An Endocrine Society Scientific Statement. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, p. s1-s66, jun., 2010.

SCHULTZE, F.C.; PETROVA, D.T.; OELLERICH, M.; ARMSTRONG, V.W.; ASIF, A.R. Differential proteome and phosphoproteome signatures in human T-lymphoblast cells induced by sirolimus. **Cell Proliferation**, v. 43, p. 396–404, 2010.

SCHWARTSMANN, G. Breast cancer in South America: challenges to improve early detection and medical management of a public health problem. **Journal Clinical Oncology**, v.19, p.118-124, 2001.

SELICHAROVA, I.; SANDA, M.; MLADKOVA, J.; OHRI, S. S.; VASHISHTA, A.; FUSEK, M.; JIRACEK, J.; VETVICKA, V. 2-DE analysis of breast cancer cell lines 1833 and 4175 with distinct metastatic organspecific potentials: comparison with parental cell line MDAMB- 231. **Oncology Report**, v. 19, p. 1237–1244, 2008.

SHAPIRO, S.; SMART, C.R.; COSTANZA, M.E.; HENSON, D.E.; HOLLEB, A.I.; HUTTER, R.V.; KRAMMER, B.; KUSHNER, H.D.; McLELLAND, R.; MOSKOWITZ, M.; *et al.* Guidelines for breast cancer screening. **Cancer**, v. 69, p. 2001-2002, 1992.

SHINOZAKI, M.; HOON, D.S.B.; GIULIANO, A.E.; HANSEN, N.M.; WANG, H.J.; TURNER, R.; TABACK, B. Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 2156-2162, 2005.

SIMONOVIC, M.; GETTINS, P.G.W.; VOLZ, K. Crystal structure of human PEDF, a potent antiangiogenic and neurite growth-promoting factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 20, p. 11131–11135, set., 2001.

SILVA, H.M.S.; ROCHA, M.L.L.; BARINI, R.C.T.; RESENDE, L.L.; REIS, J.H.P.; PAULA, R.A.; VILCHES, S.K. Radioguided surgery in mastology. **Feminina**. v. 34, p. 667–672, 2006.

SILVA, D. M.; SADDI, V. A.; MOMOTUK, E. G. Marcadores moleculares associados ao câncer de mama não metastático. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p. 39-48, 2002.

SOERJOMATARAM, I.; LOUWMAN, M.W.; RIBOT, J.G.; ROUKEMA, J.A.; COERBERGH, J.W. An overview of prognostic factors for long-term survivor of breast. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 107, p. 309-330, 2008.

SOMIARI, R. I.; SOMIARI, S.; RUSSELL, S.; SHRIVER, C. D. Proteomics of breast carcinoma. **Journal of Chromatography B**, v. 815, p. 215-225, 2005.

SORENSEN, J.; HERTZ, A. Cost-effectiveness of a systematic training programme in breast self-examination. **European Journal Cancer Prevention**, v. 12, p. 289-294, 2003.

SUTTON, C.W.; RUSTOGI, N.; GURKAN, C.; SCALLY, A.; LOIZIDOU, M.A.; HADJISAVVAS, A.; KYRIACOU, K. Quantitative Proteomic Profiling of Matched Normal and Tumor Breast Tissues. **Journal of Proteoma Research**, v. 9, p. 3891–3902, 2010.

TEXEIRA, P.C. **Análise proteômica no miocárdio de pacientes com cardiopatia chagásica crônica: alterações no metabolismo energético cardíaco**. 294 f. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TUMA, M.C.; MALIKZAY1, A.; OUYANG, X.; SURGULADZE, D.; FLEMING, J.; MITELMAN, S.; CAMARA, M.; FINNERTY, B.; DOODY, J.; CHEKLER, E.L.P.; KUSSIE, P.; TONRA, J.R. Antitumor Activity of IMC-038525, a Novel Oral Tubulin Polymerization Inhibitor. **Translational Oncology**, v. 3, n. 5, p. 318-325, out., 2010.

TUMOR SUPPRESSOR GENE INACTIVATION OR DELETION. Disponível em: <www.sigmaaldrich.com>. Acesso em: 02/04/2011.

TURASHVILI, G.; BOUCHAL, J.; BURKADZE, G.; KOLÁR, Z. Differentiation of tumours of ductal and lobular origin: I. Proteomics of invasive ductal and lobular breast carcinomas. **Biomedical Papers**, v. 149, n. 1, p. 57-62, 2005.

TURASHVILI, G.; BOUCHAL, J.; EHRMANN, J.; FRIDMAN, E.; SKARDA, J.; KOLAR, Z. Novel immunohistochemical markers for the differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc**, v. 151, n. 1, p. 59-64, 2007.

TLSTY, T.D.; CRAWFORD, Y.G.; HOLST, C.R.; FORDYCE, C.A.; ZHANG, J.; MCDERMOTT, K.; KOZAKIEWICZ, K.; GAUTHIER, M.L. Genetic and Epigenetic Changes in Mammary Epithelial Cells May Mimic Early Events in Carcinogenesis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**. v. 9, n. 3, 2004.

TURASHVILI, G.; BOUCHAL, J.; BURKADZE, G.; KOLÁR, Z. Differentiation of tumours of ductal and lobular origin: I. Proteomics of invasive ductal and lobular breast carcinomas. **Biomedical Papers**, v. 149, n. 1, p. 57-62, 2005.

TURASHVILI, G.; BOUCHAL, J.; EHRMANN, J.; FRIDMAN, E.; SKARDA, J.; KOLAR, Z. Novel immunohistochemical markers for the differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc**, v. 151, n. 1, p. 59-64, 2007.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J.M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews**, London, v. 7, n. 9, p. 659-72, 2007.

VENTER, J.C. ; ADAMS, M.D. ; MYERS, E.W. *et al.* The sequence of the human genome. **Science**, v. 291, p.1304–51, 2001.

VERMA, M; SRIVASTAVA, S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. **Lancet Oncology**, v. 3, n. 12, p. 755-763, 2002.

VIANA, L.; MARTINS, M.; GEBER, S. **Ginecologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

YAMAZAKI, D.; KURISU, S.; TAKENAWA, T. Regulation of cancer cell motility through actin Reorganization. **Cancer Science**, v. 96, p. 379–386, jul., 2005.

WARRI, A.; SASRINEN, N.M.; MAKELA, S.I. Can modulation of mammary gland development by dietary factors support breast cancer prevention?. **Hormone Research**, v. 168, p. 248-260, 2007.

WEINBERG, R.A. Tumor suppressor genes. **Science**, Washington, v. 245, p. 1138-1145, 1991.

WEINSTEIN, S.P.; OREL, S.G.; HELLER, R.; REYNOLDES, C.; CZERNIECKI, B.; SOLIN, L.J.; SCHNALL, M. MR imaging of the breast in patients with invasive lobular carcinoma. **American Journal Roentgenology**, v. 176, p. 399-406, 2001.

WELSH, J. Targets of Vitamin D Receptor Signaling in the Mammary Gland. **Journal Bone Miner Research**, v. 22, p. 86–90, 2007.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Part III: Course Manual, Step 9: In-gel digestion. In: WESTERMEIER, R; NAVEN, T. (Ed.). **Proteomics in Practice. A laboratory Manual of Proteome Analysis**. Wiley-VCH, 2004. p.261.

WIJNHOFEN, B.P.; DINJENS, W.N.; PIGNATELLI, M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. **The British journal of surgery**, Chichester, v. 87 (8), p. 992-1005, 2000.

WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J.C.; GOOLEY, A.A.; APPEL, R.D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER D.F.; WILLIAMS, K.L.; Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 19-50, 1996.

WOODWARD, W.; CHEN, M.S.; BEHBOD, F.; ROSEN, J.M.. On mammary stem cells. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 3585-3594, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World health statistics 2008. Disponível em: <http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS08_Full.pdf>. Acesso em: 19/08/2009.

WYSOCKY, V.H.; RESING, K.A.; ZHANG, Q.; CHENG, G. Mass spectrometry of peptides and proteins. **Methods**. Mar., v. 35, n. 3, p.211-22, 2005.

YODER, B.J.; WILKINSON, E.J.; MASSOL, N.A. Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast. **The Breast Journal**, v. 13, n. 2, p. 172-179, 2007.

ZHANG, D.; TAI, L. K.; WONG, L. L.; CHIU, L. L.; SETHI, S. K.; KOAY, E. S. Proteomic study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu-positive breast cancer. **Molecular Cellular Proteomics**, v. 4, p. 1686–96, 2005.

ZHU, H; BILGIN, M.; SNYDER, M. Proteomics. **Annual Review of Biochemistry**, v.72, p. 783–812, 2003.

ZOLOTARJOVA N, MARTOSELLA J, NICOL G, BAILEY J, BOYES BE, BARRETT WC. Differences among techniques for high-abundant protein depletion. **Proteomics**. v. 5, p. 3304–3313, 2005.

CAPÍTULO 1

PADRÃO DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO PROTEOMA DO CARCINOMA MAMÁRIO LOBULAR E DUCTAL

RESUMO

O câncer de mama apresenta uma alta incidência, aparecendo como o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. Os subtipos histológicos mais freqüentes nesta doença são o carcinoma lobular (CL) e o carcinoma ductal (CD), que correspondem a cerca de 15% e 80% dos casos, respectivamente. Estes subtipos apresentam comportamento diverso, tanto clínico como de resposta à terapia, justificando a pesquisa por novos marcadores para serem utilizados na diferenciação entre estes. Considerando a abordagem proteômica como uma ferramenta analítica poderosa na identificação das funções biológicas e protéicas, além das inter-relações protéicas, o estudo comparativo do proteoma das pacientes com carcinoma lobular e ductal é uma interessante forma de se identificar proteínas diferencialmente expressas. Neste estudo, avaliamos a diferença de expressão protéica de seis amostras de tecido mamário de pacientes com carcinoma, sendo três ductais e três lobulares. Para tanto, utilizamos a técnica de separação por eletroforese bidimensional, e a identificação protéica foi feita por espectrometria de massas. A partir desta análise, 30 *spots* tiveram identificação positiva, correspondendo a 26 proteínas diferencialmente expressas entre os dois subtipos tumorais. Estas alterações apontaram para proteínas relacionadas a diversos processos biológicos, que podem desempenhar um papel importante nas propriedades tipo-específico de cada tumor, subdivididas em seis categorias, de acordo com suas principais funções: proteínas estruturais (64,7%); enzimas metabólicas (5,9%); chaperonas moleculares/ proteínas *heat shock* (9,8%); regulação da diferenciação e proliferação (2%); proteínas de ligação (2%) e de transporte (15,7%). Nossos dados sugerem que o CL difere do CD no padrão de expressão protéica, fornecendo evidências complexas da inter-relação entre os subtipos histológicos. Como, por exemplo, a baixa regulação da proteína de ligação à vitamina D, tropomiosina cadeia alfa-3, triose-fosfato isomerase e a endoplasmina, encontradas no CL. Os achados protéicos tanto do CD quanto do CL sugerem importantes aplicações clínicas como potenciais biomarcadores, inclusive para terapias direcionadas. No entanto, sugerimos a realização de mais estudos para compreender as diferenças observadas e para fornecer informações consistentes sobre a correlação destas proteínas com o diagnóstico, tratamento e prognóstico de cada subtipo histológico.

Palavras-Chaves: Câncer de mama, carcinoma lobular, carcinoma ductal, proteômica.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença multifatorial e apresenta uma grande variabilidade clínica e histopatológica. Sua etiologia é complexa, sendo influenciada tanto por fatores endógenos, como as taxas hormonais e predisposição genética, como por fatores exógenos, como dieta, consumo de álcool, uso de contraceptivos orais, entre outros (RADICE e REDAELLI, 2003). De acordo com a Organização Mundial da Saúde os carcinomas mamários são classificados, quanto à sua localização e extensão, em carcinoma *in situ* e invasor e, de acordo com a origem, dividindo-se em ductais (cerca de 80% dos tumores) e lobulares (cerca de 10 a 15%). Estes subtipos apresentam comportamento diverso, tanto clínico como de resposta à terapia, justificando a pesquisa por novos marcadores para serem utilizados na diferenciação entre estes (TURASHVILI *et al.*, 2007). Os tumores lobulares são considerados de melhor prognóstico, por apresentarem crescimento mais lento do que os tumores ductais e serem positivos para os receptores de estrogênio e progesterona, freqüentemente são negativos para a expressão do fator de crescimento epitelial humano, além de incluírem a perda de expressão do gene da E-caderina. Estudos genômicos também demonstraram outras diferenças do carcinoma lobular, como a perda cromossômica em 16q e ganho em 1p. Tais estudos sugerem que estes subtipos tumorais apresentam vias distintas no desenvolvimento e progressão tumoral. Embora o tratamento desses dois subtipos seja similar, os carcinomas lobulares metastatizam para sítios menos comuns, como o trato gastrointestinal, e são menos responsivos a terapias neoadjuvantes (KORKOLA *et al.*, 2003; TURASHVILI *et al.*, 2005). Portanto, apesar dos avanços das últimas décadas tanto na detecção precoce do câncer como no tratamento, ainda há a necessidade de se identificar marcadores capazes de discriminar subtipos e personalizar terapias. Nesta direção, a abordagem proteômica, baseada na eletroforese bidimensional (2-DE) e identificação protéica por espectrometria de massa (MS) é um dos métodos mais promissores, por permitir análises diretas da expressão protéica diferencial e das modificações pós-traducionais (PUCCI-MINAFRA, 2007).

Neste estudo foram analisadas seis amostras de carcinomas mamários, sendo três ductais e três lobulares, utilizando 2-DE e MS, com o objetivo de

comparar o proteoma representativo das amostras de carcinomas lobulares e ductais. A partir desta análise, 30 *spots* tiveram identificação positiva, correspondendo a 26 proteínas diferencialmente expressas entre as pacientes com CD e CL. Estas proteínas foram subdivididas em seis categorias, de acordo com suas principais funções biológicas: proteínas estruturais, enzimas metabólicas, chaperonas moleculares/ proteínas *heat shock*, regulação da diferenciação e proliferação, proteínas de ligação e de transporte.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

As amostras de tecidos tumorais primários de seis pacientes com idade média de $56,17 \pm 7,33$ anos, foram coletadas durante o procedimento cirúrgico nos Hospitais Nossa Senhora das Graças e das Clinicas (Curitiba, Paraná, Brasil), no período de 2007 a 2009, após assinatura do consentimento informado.

Após serem imediatamente transferidas ao Departamento de Genética (UFPR), eram processadas e armazenadas a -80°C até o momento da extração protéica. As pacientes não tinham história familiar de câncer de mama. A Tabela 1 apresenta as informações clínico-patológicas obtidas.

TABELA 1 – CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

| AMOSTRAS DE TECIDO TUMORAL | | | | | | | | |
|----------------------------|---------|---------------------------|------|---------|----------|----------|----------|-----------------------|
| Cod. | Idade | Tipo Histológico | Grau | Tamanho | RE | RP | HER2 | Metástases Linfonodos |
| CP 585 | 66 anos | Carcinoma Lobular Invasor | II | 40 mm | Positivo | Negativo | Negativo | Sim |
| CP 596 | 50 anos | Carcinoma Lobular | I | 35 mm | Positivo | Positivo | Negativo | Sim |
| CP 638 | 48 anos | Carcinoma Lobular Invasor | II | 70 mm | Positivo | Positivo | Negativo | Sim |
| CP 630 | 52 anos | Carcinoma Ductal Invasor | I | 28 mm | Positivo | Positivo | Positivo | Sim |
| CP 641 | 58 anos | Carcinoma Ductal Invasor | II | 100 mm | Negativo | Negativo | Positivo | Sim |
| CP 645 | 63 anos | Carcinoma Ductal Invasor | II | 16 mm | Positivo | Positivo | Negativo | Sim |

NOTA: **Cod** – código das amostras, **grau** – grau histológico dos tumores, **RE** – receptor de estrogênio, **RP** - receptor de progesterona, **HER2** – amplificação do oncogene *ERBB2/HER2*.

Extração das proteínas

A lise das células foi realizada em tubos contendo 0,2g de amostra dissolvidas em 1 mL de Tampão de Lise (7mol/L uréia, 2mol/L tiouréia, 40mmol/L DTT, 4% CHAPS e 0,2% inibidor de protease PMSF). O tecido foi desagregado e

homogeneizado com homogeneizador elétrico; e depois sonicados em 6 ciclos de 10 segundos, potência de 30% em sonicador (*Fisher Scientific*), intercaladas por 1 minuto em banho de gelo. Após a centrifugação (12.000rpm, 15 minutos, 4°C), o sobrenadante contendo as proteínas solubilizadas foi aliquoteado e estocado a -80°C até o momento de uso. A concentração protéica foi mensurada utilizando-se o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Eletroforese Bidimensional

As proteínas extraídas (1000 µg) foram reidratadas em tampão contendo 7 mol/L de uréia, 2 mol/L de tiouréia e 2% de CHAPS, 0,5% de tampão IPG, 50mmol/L de DTT num volume total de 250 µL. Foram submetidas a IEF utilizando-se tiras IPG de 13cm e pH na faixa de 4 a 7. A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida 10% (SDS/PAGE), de acordo com o método descrito por Laemmli (1970) e as proteínas foram visualizadas após coloração com Coomassie coloidal (WESTERMEIER e HAVEN, 2004).

Aquisição de imagens e análise dos dados

Os géis bidimensionais foram digitalizados utilizando o *ImageScanner™ II* (GE Healthcare) e analisados com o programa *ImageMaster™ 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare). Os géis representativos de cada tipo de tumor foram comparados para verificar a diferença de expressão. O parâmetro utilizado na análise estatística foi o volume relativo dos *spots*. Para a normalização, o volume de cada *spot* foi dividido pelo volume total dos *spots* detectados e multiplicado por 100. Tais dados foram analisados estatisticamente através do teste *t de Student*, considerando como *spots* diferencialmente expressos os que apresentassem uma variação estatística significativa ($p < 0,05$).

Identificação das proteínas diferencialmente expressas

Os *spots* considerados diferencialmente expressos foram retirados manualmente do gel e colocados em tubos de 0,5 mL contendo 200 µL de solução para descorar (50% de acetonitrila, 25mmol/L de bicarbonato de amônio) por uma hora. Para a digestão proteolítica *in gel*, os *spots* selecionados foram reidratados em 10 µL de solução de tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin - Promega*) (15

ng/ μ L em tampão contendo 40 mmol/L de bicarbonato de amônio e 10% de acetonitrila) por 30 minutos em banho de gelo. Após esse período, a digestão foi realizada a 37° C por 16 a 20 horas. A solução contendo os peptídeos foi misturada na proporção 1:1 com solução de 50% de acetonitrila, 0,1% de ácido trifluoracético saturada com matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinamínico). A partir do volume final de 2 μ L, foi aplicado 1 μ L da mistura na placa para MALDI (*scout MTP MALDI ion source 384 target - Bruker Daltonics*). As massas dos peptídeos tripticos foram determinadas utilizando um espectrômetro de massa MALDI-ToF/ToF/MS/MS modelo *Autoflex II (Bruker Daltonics)*. O *software* utilizado foi o *FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics)*. A análise e tratamento dos espectros foi feita utilizando o programa *FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics)*. As proteínas foram identificadas utilizando o programa MASCOT (Matrix Science, London, UK) associado ao uso do banco de dados *Swiss-Prot*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na pesquisa de proteínas diferencialmente expressas, foram analisados 18 *spots* nas amostras de carcinomas ductais e os correspondentes nas amostras de carcinomas lobulares (FIGURA 01). Essa abordagem foi necessária para validar a informação de que ambos os *spots* correspondem à mesma proteína, expressa em cada tumor. Além destes, foram submetidos à análise mais dois *spots* expressos exclusivamente no carcinoma lobular e três no carcinoma ductal (*spots* ID: 2621, 2302, 676, 693 e 1075). Do total, 30 *spots* tiveram identificação positiva, correspondendo a 26 proteínas diferentes (listadas na Tabela 2) com a expressão aumentada ou diminuída na comparação entre os subtipos. Os *spots* 925, 829, 720 e 723 (CD) apresentaram identificação protéica diversa aos correspondentes (2658, 2530, 2443 e 2420, respectivamente no CL) e serão discutidos posteriormente. Em alguns casos, a mesma proteína foi identificada por diferentes *spots*, em localizações distintas no gel de referência. Isso ocorre devido a modificações pós-traducionais, que podem alterar o ponto isoelétrico e massa molecular das proteínas. As diferenças entre massas moleculares e/ ou pontos isoelétricos observados e teóricos entre estes *spots* se devem à presença de diferentes isoformas da mesma

proteína. Das 26 proteínas identificadas cerca de 23% foram representadas por diversos *spots*.

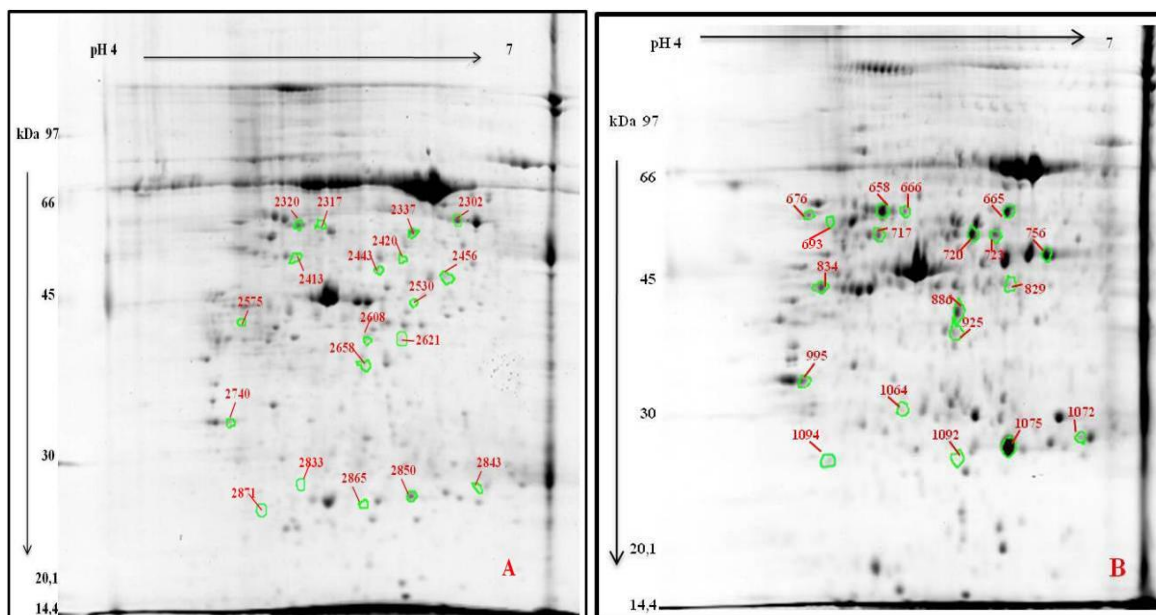


FIGURA 01. MAPAS PROTEÔMICOS BIDIMENSIONAIS

LEGENDA: A – Proteínas expressas no Carcinoma Lobular e B – Proteínas expressas no Carcinoma Ductal. Os números representam o *SPOT* ID das proteínas diferencialmente expressas entre os grupos, que foram submetidos à espectrometria de massa.

A TABELA 2 apresenta as proteínas diferenciais identificadas, subdivididas de acordo com a sua principal função biológica (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2006). No entanto, as proteínas, apesar de terem sido classificadas em determinada função, podem também apresentar outras funções biológicas. Deste modo, as proteínas foram subdivididas em proteína estruturais (64,7%), enzimas metabólicas (5,9%), chaperonas moleculares/ proteínas *heat shock* (9,8%), regulação da diferenciação e proliferação (2%), proteínas de ligação (2%) e de transporte (15,7%) (GRÁFICO 01). A análise comparativa da expressão protéica entre cada grupo de tumor foi realizada após a normalização do volume, aplicado ao *software ImageMaster*, utilizando como parâmetro o volume relativo dos *spots*. Tais dados foram analisados estatisticamente através do teste *t de Student*, considerando como *spots* diferencialmente expressos os que apresentassem uma variação estatística significativa ($p < 0,05$).

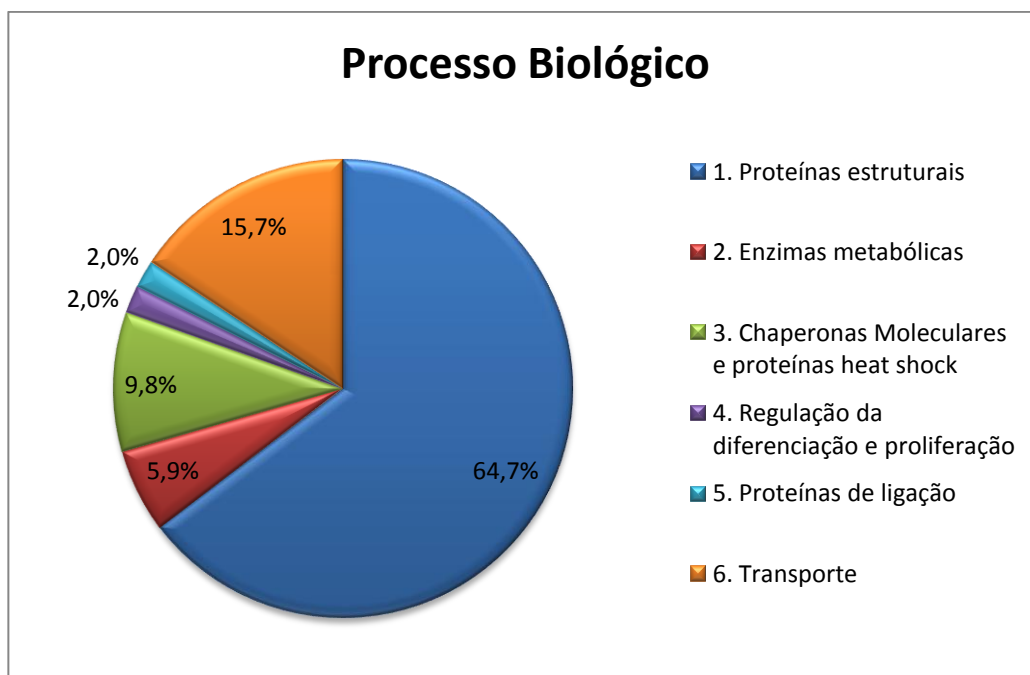


GRÁFICO 01 – Classificação das proteínas identificadas de acordo com sua função biológica.

FONTE: o autor (2011)

NOTA: Distribuição das 30 proteínas identificadas de acordo com sua função biológica em 6 categorias. A classificação foi feita com base nas informações disponíveis na literatura e nos bancos de dados do *UniProtKB/ Swiss-Prot* e do *GeneOntology*.

TABELA 2: PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NO CARCINOMA LOBULAR E DUCTAL IDENTIFICADAS POR PMF e MS/MS

| Código UniprotKB | Nome da proteína (Sigla) | Spot ID | Nível diferencial do Spot | Valor de p | Região Crom. | MASCOT Score | Tol. (ppm) | MM (kDa) / pI Teórico | MM (kDa) / pI Observado | Cobertura de sequência (%) | Nº de peptídeos sobrepostos |
|---------------------------------|--|-------------|---------------------------|------------|--------------|--------------|------------|-----------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 1. Proteínas Estruturais | | | | | | | | | | | |
| Q96HG5 | Actina Citoplasmática 1 (ACTB) | 886 | 5,06 | 0,05 | 7p22.1 | 70 | 100 | 42,0/ 5,29 | 40,0/ 5,81 | 0,23 | 6/17 |
| | | 2608 | -5,06 | 0,05 | 7p22.1 | 59 | 50 | 42,0/5,29 | 41,0/ 5,76 | 13% | 4/6 |
| | | 2530 | -4,49 | 0,05 | 7p22.1 | 69 | 40 | 42,0/5,29 | 44,0/ 6,06 | 19% | 6/15 |
| | | 2658 | -2,26 | 0,02 | 7p22.1 | 60 | 40 | 42,0/5,29 | 38,0/ 5,75 | 18% | 5/12 |
| P63261 | Actina Citoplasmática 2 (ACTG) | 886 | 5,06 | 0,05 | 17q25.3 | 70 | 100 | 42,1/ 5,31 | 40,0/ 5,81 | 0,23 | 6/17 |
| | | 2608 | -5,06 | 0,05 | 17q25.3 | 59 | 50 | 42,1/ 5,31 | 41,0/ 5,76 | 13% | 4/6 |
| | | 2530 | -4,49 | 0,05 | 17q25.3 | 69 | 40 | 42,1/ 5,31 | 44,0/ 6,07 | 19% | 6/15 |
| | | 2658 | -2,26 | 0,02 | 17q25.3 | 60 | 40 | 42,1/ 5,31 | 38,0/ 5,75 | 18% | 5/12 |
| P62736 | Alfa- actina, músculo liso aórtico (ACTA) | 829 | 4,49 | 0,05 | 10q23.31 | 37 | 100 | 42,3/ 5,23 | 43,0/ 6,02 | - | - |
| P61158 | Actina - relacionada a proteína 3 (ARP3) | 723 | 2,58 | 0,05 | 2q14.1 | 40 | 100 | 47,7/ 5,61 | 54,0/ 5,98 | - | - |
| P52907 | F-actina-capping proteína de subunidade alfa-1 (CAZA1) | 925 | 2,26 | 0,02 | 1p13.2 | 60 | 100 | 33,0/ 5,45 | 38,0/ 5,79 | 0,29 | 5/18 |
| P06753 | Tropomiosina cadeia alfa-3 (TPM3) | 995 | 2,07 | 0,05 | 1q21.3 | 83 | 100 | 32,8/ 4,68 | 33,0/ 4,84 | 0,17 | 7/11 |
| | | 2740 | -2,07 | 0,05 | 1q21.3 | 65 | 65 | 32,8/ 4,68 | 33,0/ 4,85 | 20% | 6/13 |
| Q71U36 | Tubulina cadeia alfa-1A (TBA1A) | 886 | 5,06 | 0,05 | 12q13.12 | 67 | 100 | 50,7/ 4,94 | 40,0/ 5,81 | 0,19 | 6/17 |
| | | 658 | 2,26 | 0,02 | 12q13.12 | 116 | 100 | 50,7/ 4,94 | 57,0/ 5,34 | 0,3 | 9/23 |
| | | 2320 | -2,26 | 0,02 | 12q13.12 | 140 | 40 | 50,7/ 4,94 | 60,0/ 5,31 | 35% | 10/16 |
| P68363 | Tubulina cadeia alfa-1B (TBA1B) | 886 | 5,06 | 0,05 | 12q13.12 | 67 | 100 | 50,8/ 4,94 | 40,0/ 5,81 | 0,19 | 6/17 |
| | | 658 | 2,26 | 0,02 | 12q13.12 | 135 | 100 | 50,8/ 4,94 | 57,0/ 5,34 | 0,33 | 10/23 |
| | | 2320 | -2,26 | 0,02 | 12q13.12 | 140 | 40 | 50,8/ 4,94 | 60,0/ 5,31 | 35% | 10/16 |
| Q9BQE3 | Tubulina cadeia alfa-1C (TBA1C) | 886 | 5,06 | 0,05 | 12q13.12 | 67 | 100 | 50,5/ 4,96 | 40,0/ 5,81 | 0,19 | 6/17 |
| | | 658 | 2,26 | 0,02 | 12q13.12 | 98 | 100 | 50,5/ 4,96 | 57,0/ 5,34 | 0,26 | 8/23 |
| | | 2320 | -2,26 | 0,02 | 12q13.12 | 121 | 40 | 50,5/ 4,96 | 60,0/ 5,31 | 32% | 9/16 |
| Q6PEY2 | Tubulina cadeia alfa-3E (TBA3E) | 658 | 2,26 | 0,02 | 2q21.1 | 66 | 100 | 50,5/ 5,00 | 57,0/ 5,34 | 0,2 | 6/23 |
| | | 2320 | -2,26 | 0,02 | 2q21.1 | 86 | 40 | 50,5/ 5,00 | 60,0/ 5,31 | 26% | 7/16 |
| P68366 | Tubulina cadeia alfa-4A (TBA4A) | 658 | 2,26 | 0,02 | 2q35 | 98 | 100 | 50,6/ 4,95 | 57,0/ 5,34 | 0,25 | 8/23 |
| | | 2320 | -2,26 | 0,02 | 2q35 | 86 | 40 | 50,6/ 4,95 | 60,0/ 5,31 | 26% | 7/16 |
| Q13748 | Tubulina cadeia alfa-3C/D (TBA3C) | 658 | 2,26 | 0,02 | 13q12.11 | 82 | 100 | 50,6/ 4,97 | 57,0/ 5,34 | 0,24 | 7/23 |
| | | 2320 | -2,26 | 0,02 | 13q12.11 | 104 | 40 | 50,6/ 4,97 | 60,0/ 5,31 | 30% | 8/16 |

(continua)

(conclusão)

| | | | | | | | | | | | |
|--|--|-------------|-------|-------|-----------|-----|-----|------------|------------|------|-------|
| Q9NY65 | Tubulina cadeia alfa-8 (TBA8) | 658 | 2,26 | 0,02 | 22q11.21 | 66 | 100 | 50,7/ 4,98 | 57,0/ 5,34 | 0,2 | 6/23 |
| | | 2320 | -2,26 | 0,02 | 22q11.21 | 70 | 40 | 50,7/ 4,94 | 60,0/ 5,31 | 22% | 6/16 |
| Q13885 | Tubulina cadeia beta-2A (TBB2A) | 2443 | -4,17 | 0,02 | 6p25.2 | 57 | 40 | 50,2/ 4,78 | 50,0/ 5,83 | 21% | 8/44 |
| Q9BVA1 | Tubulina cadeia beta-2B (TBB2B) | 2443 | -4,17 | 0,02 | 6p25.2 | 57 | 40 | 50,3/ 4,78 | 50,0/ 5,83 | 21% | 8/44 |
| P07437 | Tubulina cadeia beta (TBB5) | 2443 | -4,17 | 0,02 | 6p21.33 | 81 | 40 | 50,0/ 4,78 | 50,0/ 5,83 | 25% | 10/44 |
| P08670 | Vimentina (VIME) | 834 | 4,69 | 0,05 | 10p13 | 188 | 100 | 53,6/ 5,06 | 43,0/ 4,96 | 0,33 | 15/19 |
| 2. Metabolismo | | | | | | | | | | | |
| P31930 | Complexo citocromo bc1 subunidade 1 (QCR1) | 2443 | -4,17 | 0,02 | 3p21.31 | 220 | 40 | 53,2/ 4,94 | 50,0/ 5,83 | 50% | 19/44 |
| P60174 | Triose-fosfato isomerase (TPIS) | 1072 | 2,44 | 0,05 | 12p.13.31 | 174 | 40 | 26,9/ 6,45 | 28,0/ 6,58 | 0,6 | 12/26 |
| | | 2843 | -2,44 | 0,05 | 12p.13.31 | 54 | 100 | 26,9/ 6,45 | 28,0/ 6,49 | - | - |
| 3. Chaperonas moleculares/ proteínas heat shock | | | | | | | | | | | |
| P14625 | Endoplasmina (ENPL) | 676 | - | 0,1 | 12q23.3 | 33 | 100 | 92,6/ 4,76 | 57,0/ 4,88 | - | - |
| | | 665 | 2,75 | 0,001 | 15q15.3 | 117 | 100 | 57,1/ 5,98 | 57,0/ 6,12 | 0,25 | 13/30 |
| P30101 | Proteína dissulfeto-isomerase A3 (PDIA3) | 2337 | -2,75 | 0,001 | 15q15.3 | 194 | 50 | 57,1/ 5,98 | 59,0/ 6,06 | 33% | 14/17 |
| | | 717 | 2,07 | 0,01 | 2p.25.1 | 24 | 100 | 48,4/ 4,95 | 51,0/ 5,28 | - | - |
| Q15084 | Proteína dissulfeto-isomerase A6 (PDIA6) | 2413 | -2,07 | 0,01 | 2p.25.2 | 74 | 50 | 48,4/ 4,95 | 53,0/ 5,28 | 15% | 5/7 |
| 4. Diferenciação e proliferação celular | | | | | | | | | | | |
| P36955 | Fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF) | 2420 | -2,58 | 0,05 | 17p13.3 | 86 | 50 | 46,4/ 5,97 | 50,0/ 5,89 | 16% | 8/ 20 |
| 5. Proteína de Ligação | | | | | | | | | | | |
| Q9NRV9 | Proteína Heme-binding (HEBP1) | 1092 | 2,55 | 0,05 | 12p13.1 | 72 | 40 | 21,1/ 5,71 | 27,0/ 5,72 | 0,29 | 5/10 |
| 6. Transporte | | | | | | | | | | | |
| P02774 | Proteína de ligação da Vitamina D (VTDB) | 666 | 2,68 | 0,05 | 4q13.3 | 60 | 50 | 54,5/ 5,40 | 56,0/ 5,45 | 0,12 | 5/13 |
| | | 2317 | -2,68 | 0,05 | 4q13.4 | 163 | 50 | 54,5/ 5,40 | 55,0/ 5,33 | 32% | 12/19 |
| | | 756 | 2,47 | 0,05 | 4q13.3 | 199 | 100 | 71,3/ 5,92 | 49,0/ 6,37 | 0,27 | 13/13 |
| | | 2456 | -2,47 | 0,05 | 4q13.3 | 99 | 100 | 71,3/ 5,92 | 49,0/ 6,27 | 16% | 7/8 |
| | | 2302 | 6,53 | 0,1 | 4q13.3 | 164 | 100 | 71,3/ 5,92 | 61,0/ 6,36 | 19% | 11/11 |
| Q9P157 | Albumina (ALBU) | 1030 | - | 0,05 | 4q13.3 | 29 | 100 | 71,3/ 5,92 | 31,0/ 5,46 | - | - |
| | | 1075 | 2,29 | 0,1 | 4q13.3 | 212 | 40 | 71,3/ 5,92 | 53,0/ 5,90 | 0,33 | 17/24 |
| | | 720 | 4,17 | 0,02 | 4q13.3 | 236 | 40 | 71,3/ 5,92 | 26,0/ 6,06 | 0,24 | 17/30 |

Spot ID - identificação do *spot* no gel, os que foram identificados no CD estão destacados em fundo cinza e o CL em branco. **MASCOT Score** – parâmetro do software Mascot que representa confiança de $p < 0,05$ na identificação da proteína; **Massa molecular (MM)/ pI Teórico** valores obtidos do banco de dados; **MM/ pI Observado** – valores obtidos através da análise de imagem. **Cobertura**: porcentagem da sequência da proteína que foi identificada. **Número de peptídeos sobrepostos**: corresponde aos picos de massa obtidos com a MS e que foram pareados com as massas teóricas, provenientes da clivagem *in silico*. **Nível diferencial do Spot** – valor referente à diferença no nível de expressão das proteínas em um tumor em relação ao outro, o valor negativo representa o nível de expressão diminuído. (-) dados não considerados na identificação por MS/MS.

Proteínas estruturais: A maioria das proteínas identificadas pertence a esta classe, com a detecção de 13 *spots*, correspondendo a 17 proteínas diferentes: Actina citoplasmática 1/ beta-actina (três isoformas), actina citoplasmática 2/ gama-actina (três isoformas), alfa- actina músculo liso aórtico, actina - relacionada a proteína 3, f-actina-capping proteína de subunidade alfa-1, tropomiosina cadeia alfa-3, tubulina cadeia alfa-1^a, tubulina cadeia alfa-1B (duas isoformas), tubulina cadeia alfa-1C (duas isoformas), tubulina cadeia alfa-3E, tubulina cadeia alfa-4A, tubulina cadeia alfa-3C/D, tubulina cadeia alfa-8, tubulina cadeia beta-2A, tubulina cadeia beta-2B, tubulina cadeia beta e vimentina. A maioria destas proteínas apresenta envolvimento na regulação da organização do citoesqueleto, assim como em vários outros processos celulares. A expressão diferencial tem sido demonstrada entre as células do tecido normal e tumoral de mama (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2007).

Neste trabalho foi observado um aumento significativo das proteínas actinas nas amostras de carcinoma ductal, dados apresentados na TABELA 2. Estas são proteínas altamente conservadas, fundamentais para a migração celular. Dentre as proteínas de actina descritas em mamíferos, foram identificados cinco tipos: CAZA1, ARP3, ACTA e ACTB/G, sendo que as duas últimas são responsáveis, entre outros efeitos, pela motilidade e sinalização das células tumorais (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2006). Durante a migração celular, o citoesqueleto de actina é dinamicamente remodelado. Com isso, fica claro que para elucidar o processo de migração das células cancerosas, será importante investigar os mecanismos subjacentes à regulação de actina e a inibição do processo de motilidade, informações que poderão auxiliar na terapêutica do câncer. Foram identificados outros reguladores da polimerização de actina, formando o complexo ARP2/3. Apesar do mecanismo não estar bem descrito, têm gerado certo interesse em razão de ser um regulador chave da nucleação de filamentos de actina (YAMAZAKI *et al.*, 2005). Recentemente, trabalhos têm sugerido uma relação entre a organização da actina e mudanças na expressão das isoformas desta proteína com a capacidade das células tumorais formarem metástase. NOWAK *et al.* (2005) demonstraram que a expressão das actinas é maior em linhagem celular de sarcoma invasivo do que em não-invasivo.

Outra proteína com função estrutural identificada foi a tropomiosina cadeia alfa-3 (TPM3). Esta proteína teve a expressão diminuída 2,07 vezes nas amostras de carcinoma lobular em relação ao ductal. Tem sido sugerido que a ausência de

tropomiosina em células tumorais pode diminuir a estabilidade dos microfilamentos de actina devido à maior suscetibilidade a fatores de despolimerização, desempenhando um papel crucial na oncogênese (FRANZEN *et al.*, 1996). Adicionalmente, trabalhos recentes confirmam que a expressão das isoformas da TPM está diminuída em tumores primários de mama, e que tumores metastáticos apresentam uma expressão relativamente alta da TPM1. Além disso, tumores de mama HER2-positivo demonstraram expressão elevada da TPM3, sugerindo que possam exercer um papel importante na disseminação das células tumorais neste tipo de câncer (LI *et al.*, 2006).

As proteínas dos microtúbulos, as tubulinas-alfa, também apresentaram aumento da expressão nas amostras de CD em relação ao CL, dados apresentado na TABELA 2. Os microtúbulos são o principal componente do citoesqueleto, e estão envolvidos numa variedade de funções celulares, tais como, na motilidade celular, transporte intracelular, progressão do ciclo celular e diferenciação. Estas são estruturas extremamente dinâmicas, compostas por heterodímeros de tubulinas alfa e beta, que juntamente com outras proteínas estruturais formam o fuso mitótico (LIANG; MACRAE, 1997; TUMA *et al.*, 2010). Vários trabalhos demonstram que a sensibilidade aos taxanos está correlacionada com os níveis de tubulina polimerizada em tecidos normais *versus* tumorais. Estes níveis estão associados, por sua vez, à expressão diferencial de proteínas relacionadas aos microtúbulos e a reguladores como a oncoproteína 18 (DOZIER *et al.*, 2003). Por outro lado, estudos clínicos preliminares mostram que a tubulina beta apresenta uma resposta positiva ao taxano. Sugere-se que a presença de superexpressão de tal tubulina poderia ser preditivo a resposta positiva a esta droga (CORTESI *et al.*, 2009).

No câncer, a expressão da vimentina está associada ao fenótipo maligno diferenciado, maior capacidade de motilidade invasiva, resistência a drogas e o pior prognóstico. A diminuição da expressão de vimentina pode alterar a transição epitélio-mesenquimal (EMT) da célula normal e a diferenciação celular. Quando aumentada pode ser um fator de predisposição a fenótipos alterados associados à EMT, que por sua vez, podem favorecer o desenvolvimento do câncer (BETANCOURT *et al.*, 2010). Estudo realizado por Domagala *et al.* (1993) caracteriza o perfil imuno-histoquímico do carcinoma lobular invasor, sugerindo que a ausência de expressão da vimentina está freqüentemente mais associada ao

carcinoma lobular do que ao ductal. Os resultados demonstram que o nível de expressão da vimentina, foi 4,69 vezes maior nas amostras de carcinoma ductal em relação ao lobular, indicando subjacentes diferenças biológicas entre os dois subtipos tumorais (TABELA 2).

Enzimas metabólicas: Neste trabalho, foram encontradas duas proteínas com funções metabólicas: a proteína UQCRC1 (*ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1*), componente do Complexo citocromo bc1, subunidade 1 e a proteína triose-fosfato isomerase (TPIS). Foram identificadas as isoformas correspondentes a TPIS, com base no valor de MM observado de 28,0 kDa muito próximo do valor esperado 27,1 kDa para a isoforma-2, resultante de *splicing* alternativo (*UniProtKB/Swiss-Prot*, 2011). Foi identificada a UQCR1 nas amostras de CL, contudo na análise comparativa o *spot* correspondente a essa proteína na amostra de CD, apresentou identificação protéica positiva para a albumina. Entretanto a identificação da UQCR1 foi mantida, porque a albumina se liga às proteínas menos abundantes, devido principalmente a sua função de carreadora, e assim pode ter impedido a identificação da UQCR1.

Como as mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) estão presentes em todos os tipos de câncer já estudados, Kulawiec *et al.* (2006) utilizaram abordagem proteômica para determinar as modificações nucleares causadas pela depleção de mtDNA, identificando a proteína UQCR1 como uma das alteradas, sugerindo sua participação na resposta retrógrada. Esta proteína é codificada no núcleo e localizada na membrana interna da mitocôndria, sendo que neste experimento mostrou-se quase 10 vezes menos expressa na linhagem com ausência de mitocôndrias. Na validação com imunohistoquímica, foi visto que 74% dos casos de carcinoma de mama apresentavam expressão para a proteína UQCR1, sugerindo importante ação na tumorigênese. A presença desta proteína exclusivamente nos carcinomas lobulares na amostra utilizada pode sugerir a presença de mutações no mtDNA em maior frequência nos ductais, mas outros experimentos devem ser realizados para testar esta hipótese (TABELA 2).

O nível diferencial da TPIS foi de 2,44 vezes mais expressa no CD do que no CL, resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$) apresentado na TABELA 2. Cortesi *et al.* (2009) investigando marcadores de resposta à quimioterapia,

estudaram proteínas secretadas no fluído intersticial tumoral (pacientes com câncer de mama) e normal e observaram um aumento da expressão da proteína TPIS, entre outras, nos pacientes com boa resposta, concluindo que este aumento pode ser preditivo de resposta positiva a quimioterápicos. A TPIS é uma enzima que catalisa a interconversão reversível de D-gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato, envolvida na gliconeogênese, glicólise e síntese de triglicerídeos. Poucos estudos analisaram a participação desta proteína na tumorigênese. Considerando-se a função da proteína na geração de energia, pode-se supor que seja importante na defesa contra o desenvolvimento do tumor. Já a sugestão de Cortesi *et al.* (2009) de que possa ser preditiva de resposta à terapia é bastante interessante, pois levanta a possibilidade de indução da via energética como uma abordagem terapêutica. O significado da expressão diferencial entre os subtipos ductal e lobular identificado na amostra utilizada permanece em aberto.

Chaperonas moleculares/ proteínas *heat shock*: Nesta classe funcional foram identificadas a endoplasmina, proteína dissulfeto-isomerase A3, e a proteína dissulfeto-isomerase A6, esta última corresponde a isoforma-2 resultante de *splicing* alternativo (*UniProtKB/ Swiss-Prot*, 2011). Todas as proteínas identificadas nesta classe fazem parte da família das proteínas de choque térmico, atuando como chaperonas, protegem contra o estresse oxidativo, regulando a dinâmica de vários componentes celulares, tais como o citoesqueleto, filamento e polímeros tubulares compostos por microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários (LIANG; MACRAE, 1997). Sendo assim, o aumento nos níveis de expressão das proteínas desta classe, observado no tecido mamário das pacientes com carcinoma ductal, poderia ser decorrente de estímulos como o estresse oxidativo e hipóxia, podendo também ser um mecanismo compensatório para suprir o provável déficit de ATP, sugerindo um papel importante destas proteínas na tumorigênese.

Na análise comparativa a endoplasmina (ENPL) foi encontrada com aumento de expressão apenas nas amostras de carcinoma ductal. Apesar desta proteína não apresentar diferença estatística ($p < 0.1$), foi selecionada para análise por espectrometria de massas, em razão de ter demonstrado a expressão desta proteína apenas no CD, tanto visualmente e como pela análise feita no *software* (TABELA 2). A ENPL é componente da família HSP90, que atua no

processamento e transporte de proteínas secretadas, na resposta a estímulos (hipóxia, estresse) e também esta envolvida no processo anti-apoptótico (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2006). Bartkowiak *et al.* (2010) relataram a expressão aumentada desta proteína em modelos celulares mimetizando condições bastante adversas, como as encontradas pelas células metastáticas (hipóxia, hipoglicemia, pH ácido etc.) sugerindo que esta contribua para a sobrevivência das células em condições adversas, inclusive após a quimioterapia. Desta forma, a endoplasmína pode ser considerada um marcador de mau prognóstico.

Estudo comparativo do proteoma, realizado em amostras de tecido mamário tumoral e de tecido normal adjacente, apresentou aumento de expressão das proteínas PDIA3 e PDIA6 no carcinoma mamário (ALLDRIDGE *et al.*, 2008). Outro trabalho demonstrou que a expressão da PDIA3 apresentou-se 5 vezes maior na linhagem celular de adenocarcinoma de mama (MCF7) do que no controle (BIANCHI *et al.*, 2005). A análise proteômica diferencial, no presente estudo, também apresentou aumento significativo na expressão destas proteínas nas amostras de CD quando comparados às amostras de CL. As duas proteínas apresentaram diferença estatística bem relevantes, principalmente a PDIA3, cuja expressão estava 2,75 vezes maior com significância de $p < 0,001$. A expressão da PDIA6 estava 2,07 vezes maior com $p < 0,01$. Estes resultados sugerem que o aumento de PDIA3 observado nas amostras de CD, pode estar correlacionado ao estresse celular elevado (TABELA 2).

O estudo de Pressinotti *et al.*, (2009) investigou a expressão diferencial do gene *PDIA3* entre câncer de próstata de baixa e alta agressividade. Relataram que, na próstata, a PDIA3 além do papel de chaperona, também parece desempenhar um papel como uma proteína pró-apoptótica. Os níveis de expressão da PDIA3 significativamente menores no CL comparado ao CD, e os resultados obtidos por Pressinotti *et al.*, (2009), pode indicar que a baixa expressão da PDIA3 possa desempenhar um papel na progressão mais lenta do carcinoma lobular, como o que foi relatado no câncer de próstata. Leys *et al.* (2007) já haviam demonstrado que a falta de expressão desta proteína está associada ao aumento da invasão tumoral e ao estágio avançado no câncer gástrico e, portanto, tem sido proposto ser um potencial marcador de prognóstico negativo.

Regulação da diferenciação e proliferação: Foi identificada a proteína do fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF), envolvida na regulação da diferenciação e proliferação. A identificação desta proteína feita no *spot* 2420, no CL, diferiu da proteína identificada no *spot* 723, no CD, sendo que este último corresponde à proteína actina (ARP3), sendo que tal pareamento foi realizado pelo *software*, informações apresentadas na TABELA 2. Este resultado demonstra que esta proteína considerada diferencialmente expressa no CD não corresponde à mesma proteína expressa nas amostras de CL. Apesar disto, a identificação desta proteína foi mantida neste trabalho por ter atendido aos critérios de identificação positiva (*score*, número de peptídeos sobrepostos e a pequena variação dos valores de MM/pl observada em relação ao esperado – ver TABELA 2. Poucos são os estudos que se preocupam em elucidar o significado prognóstico da expressão do PEDF envolvidos na tumorigênese mamária. Cai *et al.* (2006) observaram que a PEDF é capaz de inibir a formação de túbulos endoteliais que foram induzidos pelo tumor. Os resultados apóiam a hipótese de que a falta de expressão desta proteína pode estar relacionado ao crescimento tumoral e a angiogênese do câncer de mama. Outro estudo *in vivo* mostrou que em camundongos sem a expressão do PEDF (*knockout*), demonstrou que esta proteína pode atuar diretamente nas células tumorais, tornando uma subpopulação de tumores menos agressivos e pouco diferenciados ou suprimindo o crescimento tumoral e/ou inibir a angiogênese induzida pelo tumor levando à supressão tumoral. Além disso, a PEDF pode contribuir para a diferenciação e sobrevivência celular (HALLIN *et al.*, 2004).

Proteína de ligação: A proteína com função de ligação identificada neste trabalho foi a proteína *Heme-binding* (HEBP1), apresentou diferença de expressão significativa de 2,55 vezes maior no carcinoma ductal do que no lobular. Em um estudo comparativo foi observada a expressão da HEBP1 significativamente super-regulada tanto no tumor primário de mama quanto no linfonodo metastático. Nesta análise verificaram a expressão aumentada 3,19 vezes no tumor com metástase em relação ao sem metástase, e também 3,30 vezes maior no linfonodo metastático em relação ao tumor sem metástase. O papel fisiológico desta proteína relaciona-se à ligação e remoção de moléculas tipo porfirina, do qual níveis aumentados em células tumorais têm sido estabelecidos (BOUCHAL *et al.*, 2009). A super regulação da

proteína HEBP1 também foi detectada em outros trabalhos com linhagem celular de câncer de mama com potencial metastático (SELICHAROVA et al., 2008). Sendo assim, o aumento nos níveis de expressão nas amostras de CD, poderia ser decorrente da super-regulação da HEBP1 neste subtipo de tumor (TABELA 2).

Transporte: No nosso estudo foram encontradas diferenças significativas de expressão da proteína de ligação a Vitamina D (VTDB), apresentando níveis 2,68 vezes mais elevados nas amostras de CD do que no CL (ver TABELA 2). O fato da proteína de ligação a vitamina D ter sido encontrada com expressão elevada no carcinoma ductal, relatado neste trabalho, foi condizente com os dados prévios da literatura. Pawlik *et al.* (2006) analisaram a expressão diferencial do carcinoma mamário invasivo entre amostras com o tumor e mamas livre da doença, através de marcação de afinidade por isótopo e por *western blot*, e confirmaram a superexpressão da VTDB nas amostras tumorais. A desregulação da sinalização da vitamina D pode conduzir a proliferação de células indiferenciadas, o que pode predispor a transformação (McCULLOUGH; BOSTICK; MAYO, 2009). Em um estudo *in vitro* com linhagem celular de câncer pancreático - BxPC-3 e outro *in vivo* com células de carcinoma hepatocelular (HCC) xenotransplantadas em camundongos, foi identificado o fator de ativação de macrófagos derivado da proteína VTDB, envolvido na inibição da angiogênese e da progressão do tumor (KISKER *et al.*, 2003; NONAKA *et al.*, 2010).

Finalmente, pode-se observar que ambos, CD e CL, apresentaram a expressão da albumina, indicando a presença desta proteína no tecido tumoral mamário, como já foi relatado na literatura (PUCCI-MINAFRA *et al.*, 2007; CORTESI *et al.*, 2009). Muitos trabalhos usam métodos de precipitação, centrifugação, cromatografia por afinidade e kits comerciais para remoção tanto da albumina como das imunoglobulinas (COLANTONIO *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2005; ZOLOTARJOVA *et al.*, 2005). Entretanto, métodos de imunodepleção têm capacidade limitada de ligação a estas proteínas abundantes, e restringem o tamanho da amostra, além dessa depleção não ser completa. Portanto, não é compatível a remoção de proteínas do plasma em amostras complexas, como o tecido mamário. É importante ressaltar, que a remoção da albumina também pode levar à remoção de pelo menos 35 proteínas ligadas a ela, tais como citocinas e

hormônios, devido a sua função fisiológica de carreadora (SUTTON *et al.*, 2010). Além disso, pode influenciar na reprodutibilidade, e por todos estes motivos optamos por não utilizar nenhum método de depleção para remover as proteínas séricas nas amostras do tecido mamário.

CONCLUSÃO

A análise comparativa do proteoma realizado por eletroforese bidimensional possibilitou a identificação de 26 proteínas diferencialmente expressas entre pacientes com CD e CL. Nossos dados reforçaram a diferença de expressão de algumas proteínas relatadas em trabalhos anteriores, além de apontar diferenças relevantes entre os dois subtipos tumorais, que devem ser confirmadas em amostras individuais.

O padrão de expressão das proteínas, presentes no tecido mamário de pacientes com CD foi o que mais apresentou diferenças em comparação com o proteoma do CL. Foram encontradas diferenças na expressão de proteínas envolvidas numa série de processos biológicos, como na apoptose, resposta ao estresse, organização do citoesqueleto, diferenciação, proliferação, progressão, angiogênese e na regulação da divisão celular, que podem desempenhar um papel importante nas propriedades tipo-específico de cada tumor. Da mesma forma, a maioria das proteínas séricas apresentou níveis mais altos no tecido mamário correspondente ao CD do que ao CL.

Nossos dados sugerem que o CL difere do CD no padrão de expressão protéica, fornecendo evidências complexas da inter-relação entre os subtipos histológicos. Como por exemplo, a baixa regulação da proteína de ligação a vitamina D, tropomiosina cadeia alfa-3, triose-fosfato isomerase e a endoplasmína, encontradas no carcinoma lobular. Os achados protéicos tanto do CD quanto do CL sugerem importantes aplicações clínicas para terapias direcionadas. No entanto mais estudos são necessários para compreender as diferenças observadas neste estudo, quanto a fornecer informações consistentes sobre a correlação destas proteínas com o diagnóstico, tratamento e prognóstico de cada subtipo histológico.

Para ter a complementação dos nossos resultados e a fim de identificar biomarcadores que possam auxiliar no tratamento diferencial, é importante o

emprego de outras metodologias, como a análise do transcriptoma ou a utilização de anticorpos em ensaios com imunohistoquímica ou *western blot*, com o intuito de validar e fundamentar a expressão das proteínas diferenciais observadas neste estudo. Estas análises auxiliarão na compreensão mais integrada das diferenças fisiológicas e moleculares dos diferentes fenótipos do câncer de mama. Com isso, talvez possamos investigar os perfis biológicos capazes de distinguir os dois subtipos tumorais e explicar as diferenças encontradas na clínica.

REFERÊNCIAS

- ALLDRIDGE, L.; METODIEVA, G.; GREENWOOD, C.; AL-JANABI, K.; THWAITES, L.; SAUVEN, P.; METODIEV, M. Proteome profiling of breast tumors by gel electrophoresis and nanoscale electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 4, p. 1458-1469, 2008.
- BARTKOWIAK, K.; EFFENBERGER, K.E.; HARDER, S.; ANDREAS, A.; BUCK, F.; KATALINIC, P.J.; PANTEL, K.; BRANDT, B.H. Discovery of a Novel Unfolded Protein Response Phenotype of Cancer Stem/Progenitor Cells from the Bone Marrow of Breast Cancer Patients. **Journal Proteome Research**, v. 9, p. 3158–3168, jan., 2010.
- BETANCOURT, A.M.; MOBLEYB, J.A.; RUSSOD, J.; LAMARTINIERE, C.A. Proteomic analysis in mammary glands of rat offspring exposed in utero to bisphenol A. **Journal of proteomics**, v. 73, p. 1241 – 1253, 2010.
- BIANCHI, L.; CANTON, C.; BINI, L.; ORLANDI, R.; MÉNARD, S.; ARMINI, A.; CATTANEO, M.; PALLINI, V.; BERNARDI, L.R.; BIUNNO, I. Protein profile changes in the human breast cancer cell line MCF-7 in response to SEL1L gene induction. **Proteomic**, v. 5, p. 2433–2442, fev., 2005.
- BOUCHAL, P.; ROUMELIOTIS, T.; HRSTKA, R.; NENUTIL, R.; VOJTESEK, B.; GARBIS, S.D. Biomarker Discovery in Low-Grade Breast Cancer Using Isobaric Stable Isotope Tags and Two-Dimensional Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (iTRAQ-2DLC MS/MS) Based Quantitative Proteomic Analysis. **Journal of Proteome Research**, v. 8 (1), p. 362–373, 2009.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CAI, J.; PARR, C.; WATKINS, G.; JIANG, W.G.; Boulton, M. Decreased Pigment Epithelium-Derived Factor Expression in Human Breast Cancer Progression. **Clinical Cancer Research**, v. 12, p. 3510-3517, jun., 2006.
- CHEN, Y.Y.; LIN, S.Y.; YEH, Y.Y.; HSIAO, H.H.; WU, C.Y.; CHEN, S.T.; WANG, A.H. A Modified Protein Precipitation Procedure For Efficient Removal Of Albumin From Serum. **Electrophoresis**, v. 26, p. 2117-27, 2005.
- COLANTONIO, D.A; DUNKINSON, C.; BOVENKAMP, D.E.; EYK, J.E.V. Effective removal of albumin from serum. **Proteomics**, v. 5, p. 3831–3835, 2005.
- CORTESI, L.; BARCHETTI, A.; DE MATTEIS, E.; ROSSI, E.; CASA, L.D.; MARCHESELLI, L.; TAZZIOLI, G.; LAZZARETTI, M.G.; FICARRA, G.; FEDERICO, M.; IANNONE, A. Identification of Protein Clusters Predictive of Response to Chemotherapy in Breast Cancer Patients. **Journal of Proteome Research**, v.8, p. 4916–4933, 2009.

DOMAGALA, W; MARKIEWSKI, M; KUBIAK, R; BARTKOWIAK, J; OSBORN, M. Immunohistochemical profile of invasive lobular carcinoma of the breast: predominantly vimentin and p53 protein negative, cathepsin D and oestrogen receptor positive. **Virchows Arch A Pathology Anatomy Histopathology**, v. 423, p. 497-502, 1993.

DOZIER, J.H.; HISER, L.; DAVIS, J.A.; THOMAS, N.S.; TUCCI, M.A.; BENGHUZZI, H.A.; FRANKFURTER, A.; CORREIA, J.J.; LOBERT, S. β class II tubulin predominates in normal and tumor breast tissues. **Breast Cancer Research**, v.5, n. 5, p. R157-R169, 2003.

FRANZEN, B.; LINDER, S.; URYU, K.; ALAIYAL, A.A.; HIRANO, T.; KATO, H.; AUER, G. Expression of tropomyosin isoforms in benign and malignant human breast lesions. **British Journal of Cancer**, v.73, p. 909-913, 1996.

GE HEALTHCARE – HANDBOOK. **2-D Electrophoresis: Principles and Methods**. Suécia: Ed. Elanders Tofters, p. 162, 2004.

HALLIN, S.; WIKSTROM, P.; RUDOLFSSON, S.H.; STATTIN, P.; DOLL, J.A.; CRAWFORD, S.E.; BERGH, A. Decreased pigment epithelium-derived factor is associated with metastatic phenotype in human and rat prostate tumors. **Cancer Research**, v. 64, p. 5664-71, 2004.

KISKER, O.; ONIZUKA, S.; BECKER, C.M.; FANNON, M.; FLYNN, E.; AMATO, R.; ZETTER, B.; FOLKMA, J.; RAY, R.; SWAMYYY, N.; SHEPHERD, S.P. Vitamin D binding protein-macrophage activating factor (DBP-maf) inhibits angiogenesis and tumor growth in mice. **Neoplasia**, v.5, p.32-40, jan., 2003.

KORKOLA, J.E.; DEVRIES, S.; FRIDLYAND, J.; HWANG, E.S.; ESTEP, A.L.H.; CHEN, Y.Y.; CHEW, K.L.; DAIRKEE, S.H.; JENSEN, R.M.; WALDMAN, F.M. Differentiation of Lobular *versus* Ductal Breast Carcinomas by Expression Microarray Analysis. **Cancer research**, v. 63, p. 7167–7175, nov., 2003

KULAWIEC, M.; ARNOUK, H.; DESOUKI, M.M.; KAZIM, L.; STILL, I.; SINGH, K.K. Proteomic Analysis of Mitochondria-to-Nucleus Retrograde Response in Human Cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 5, p. 967-975, agos., 2006.

LAEMMLI, U.K. SDS-PAGE. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEYS, C.M.; NOMURA, S; LAFLEUR, B.J.; FERRONE, S.; KAMINISHI, M.; MONTGOMERY, E.; GOLDENRING, J.R. Expression and prognostic significance of prothymosin-alpha and ERp57 in human gastric cancer. **Surgery**, v. 141, p. 41-50, 2007.

LI, C.I.; DALING, J.R.; MALONE, K.E.; BERNSTEIN, L.; MARCHBANKS, P.A.; LIFF, J.M.; STROM, B.L.; SIMON, M.S.; PRESS, M.F.; MCDONALD, J.A.; URSIN, G.; BURKMAN, R.T.; DEAPEN, D.; SPIRTAS, R. Relationship between Established Breast Cancer Risk Factors and Risk of Seven Different Histologic Types of Invasive Breast Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.15, n.5, p. 946–54, mai., 2006.

LIANG, P.; MACRAE, T.H. Molecular chaperones and the cytoskeleton. **Journal of Cell Science**, v.110, p.1431-1440, 1997.

McCULLOUGH, M.L.; BOSTICK, R.M.; MAYO, T.L. Vitamin D Gene Pathway Polymorphisms and Risk of Colorectal, Breast, and Prostate Cancer. **Annual Review of Nutrition**, v. 29, p. 111–32, 2009.

NONAKA, K.; ONIZUKA, S.; ISHIBASHI, H.; UTO, Y.; HORI, H.; NAKAYAMA, T.; MATSUURA, N.; KANEMATSU, T.; FUJIOKA, H. Vitamin D Binding Protein-Macrophage Activating Factor Inhibits HCC in SCID Mice. **Journal of Surgical Research**, v. 12, p 1-7, 2010.

NOWAK, D., SKWAREK-MARUSZEWSKA, A., ZEMANEK-ZBOCH, M., MALICKA-BŁASZKIEWICZ, M. Beta-actin in human colon adenocarcinoma cell lines with different metastatic potential. **Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 2, p. 461–468, 2005.

PAWLIK, T.M.; HAWKE, D.H.; LIU, Y.; KRISHNAMURTHY, S.; FRITSCH, H.; HUNT, K.K.; KUERER, H.M. Proteomic analysis of nipple aspirate fluid from women with early-stage breast cancer using isotope-coded affinity tags and tandem mass spectrometry reveals differential expression of vitamin D binding protein. **Biomedcentral Cancer**, v. 6, p.68, out., 2006.

PRESSINOTTI, N.C.; KLOCKER, H.; SCHÄFER, G.; DUC LUU, V.; RUSCHHAUPT, M.; KUNER, R.; STEINER, E.; POUSTKA, A.; BARTSCH, G.; SÜLTMANN, H. Differential expression of apoptotic genes *PDIA3* and *MAP3K5* distinguishes between low- and high-risk prostate cancer. **Molecular Cancer**, v. 8, p. 130. dez., 2009.

PUCCI-MINAFRA, I. P.; CANCEMI, P.; FONTANA, S.; MINAFRA, L.; FEO, S.; BECCHI, M.; FREYRIA, A. M.; MINAFRA, S. Expanding the protein catalogue in the proteome reference map of human breast cancer cells. **Proteomics**, v. 6, p. 2609-2625, 2006.

PUCCI-MINAFRA, I.; CANCEMI, P.; MARABETI, M.R.; ALBANESE, N.N.; DI CARA, G.; TAORMINA, P.; MARRAZZO, A. Proteomic profiling of 13 paired ductal infiltrating breast carcinomas and non-tumoral adjacent counterparts. **Proteomics - Clinical Application**, v. 1, p. 118–129, 2007.

RADICE, D.; REDAELLI, A. Breast cancer management: quality-of-life and cost considerations. **Pharmacoeconomics**, v. 21, n. 6, p. 383-396, 2003.

SELICHAROVA, I.; SANDA, M.; MLADKOVA, J.; OHRI, S. S.; VASHISHTA, A.; FUSEK, M.; JIRACEK, J.; VETVICKA, V. 2-DE analysis of breast cancer cell lines 1833 and 4175 with distinct metastatic organspecific potentials: comparison with parental cell line MDAMB- 231. **Oncology Report**, v. 19, p. 1237–1244, 2008.

SUTTON, C.W.; RUSTOGI, N.; GURKAN, C.; SCALLY, A.; LOIZIDOU, M.A.; HADJISAVVAS, A.; KYRIACOU, K. Quantitative Proteomic Profiling of Matched

Normal and Tumor Breast Tissues. **Journal of Proteoma Research**, v. 9, p. 3891–3902, 2010.

TUMA, M.C.; MALIKZAY1, A.; OUYANG, X.; SURGULADZE, D.; FLEMING, J.; MITELMAN, S.; CAMARA, M.; FINNERTY, B.; DOODY, J.; CHEKLER, E.L.P.; KUSSIE, P.; TONRA, J.R. Antitumor Activity of IMC-038525, a Novel Oral Tubulin Polymerization Inhibitor. **Translational Oncology**, v. 3, n. 5, p. 318-325, out., 2010.

TURASHVILI, G.; BOUCHAL, J.; BURKADZE, G.; KOLÁR, Z. Differentiation of tumours of ductal and lobular origin: I. Proteomics of invasive ductal and lobular breast carcinomas. **Biomedical Papers**, v. 149, n. 1, p. 57-62, 2005.

TURASHVILI, G.; BOUCHAL, J.; EHRMANN, J.; FRIDMAN, E.; SKARDA, J.; KOLAR, Z. Novel immunohistochemical markers for the differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc**, v. 151, n. 1, p. 59-64, 2007.

YAMAZAKI, D.; KURISU, S.; TAKENAWA, T. Regulation of cancer cell motility through actin Reorganization. **Cancer Science**, v.96, p. 379–386, jul., 2005.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. Part III: Course Manual, Step 9: In-gel digestion. In: WESTERMEIER, R; NAVEN, T. (Ed.). **Proteomics in Practice. A laboratory Manual of Proteome Analysis**. Wiley-VCH, 2004. p.261.

ZOLOTARJOVA N, MARTOSELLA J, NICOL G, BAILEY J, BOYES BE, BARRETT WC. Differences among techniques for high-abundant protein depletion. **Proteomics**. v. 5, p. 3304–3313, 2005.

APÊNDICES

| | | |
|--------------------|--|------------|
| APÊNDICE 01 | Proteínas estatisticamente significativas detectadas no carcinoma ductal e lobular separadas quanto a sua função..... | 141 |
| APÊNDICE 02 | Parâmetros utilizados para validação das proteínas..... | 143 |

APÊNDICE 01
PROTEÍNAS ESTATÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS DETECTADAS NO CARCINOMA DUCTAL E LOBULAR SEPARADAS QUANTO A SUA FUNÇÃO

| Código UniprotKB | Nome da proteína (Sigla) | Spot ID | Nível diferencial do Spot | n - 2 | Teste t | Valor de p |
|---------------------------------|--|----------------|----------------------------------|--------------|----------------|-------------------|
| 1. Proteínas Estruturais | | | | | | |
| Q96HG5 | Actina Citoplasmática 1 (ACTB) | 886 | 5,06 | 3 | 3,87 | 0,05 |
| | | 2608 | -5,06 | 3 | 3,87 | 0,05 |
| | | 2530 | -4,49 | 2 | 4,96 | 0,05 |
| | | 2658 | -2,26 | 3 | 5,19 | 0,02 |
| P63261 | Actina Citoplasmática 2 (ACTG) | 886 | 5,06 | 3 | 3,87 | 0,05 |
| | | 2608 | -5,06 | 3 | 3,87 | 0,05 |
| | | 2530 | -4,49 | 2 | 4,96 | 0,05 |
| | | 2658 | -2,26 | 3 | 5,19 | 0,02 |
| P62736 | Alfa- actina, músculo liso aórtico (ACTA) | 829 | 4,49 | 2 | 4,96 | 0,05 |
| P61158 | Actina - relacionada a proteína 3 (ARP3) | 723 | 2,58 | 3 | 3,40 | 0,05 |
| P52907 | F-actina-capping proteína de subunidade alfa-1 (CAZA1) | 925 | 2,26 | 3 | 5,19 | 0,02 |
| P06753 | Tropomiosina cadeia alfa-3 (TPM3) | 995 | 2,07 | 3 | 4,17 | 0,05 |
| | | 2740 | -2,07 | 3 | 4,17 | 0,05 |
| Q71U36 | Tubulina cadeia alfa-1A (TBA1A) | 886 | 5,06 | 3 | 3,87 | 0,05 |
| | | 658 | 2,26 | 4 | 3,87 | 0,02 |
| | | 2320 | -2,26 | 4 | 3,87 | 0,02 |
| P68363 | Tubulina cadeia alfa-1B (TBA1B) | 886 | 5,06 | 3 | 3,87 | 0,05 |
| | | 658 | 2,26 | 4 | 3,87 | 0,02 |
| | | 2320 | -2,26 | 4 | 3,87 | 0,02 |
| Q9BQE3 | Tubulina cadeia alfa-1C (TBA1C) | 886 | 5,06 | 3 | 3,87 | 0,05 |
| | | 658 | 2,26 | 4 | 3,87 | 0,02 |
| | | 2320 | -2,26 | 4 | 3,87 | 0,02 |
| Q6PEY2 | Tubulina cadeia alfa-3E (TBA3E) | 658 | 2,26 | 4 | 3,87 | 0,02 |
| | | 2320 | -2,26 | 4 | 3,87 | 0,02 |
| P68366 | Tubulina cadeia alfa-4A (TBA4A) | 658 | 2,26 | 4 | 3,87 | 0,02 |
| | | 2320 | -2,26 | 4 | 3,87 | 0,02 |
| Q13748 | Tubulina cadeia alfa-3C/D (TBA3C) | 658 | 2,26 | 4 | 3,87 | 0,02 |
| | | 2320 | -2,26 | 4 | 3,87 | 0,02 |
| Q9NY65 | Tubulina cadeia alfa-8 (TBA8) | 658 | 2,26 | 4 | 3,87 | 0,02 |
| | | 2320 | -2,26 | 4 | 3,87 | 0,02 |
| Q13885 | Tubulina cadeia beta-2A (TBB2A) | 2443 | -4,17 | 4 | 4,07 | 0,02 |
| Q9BVA1 | Tubulina cadeia beta-2B (TBB2B) | 2443 | -4,17 | 4 | 4,07 | 0,02 |
| P07437 | Tubulina cadeia beta (TBB5) | 2443 | -4,17 | 4 | 4,07 | 0,02 |
| P08670 | Vimentina (VIME) | 834 | 4,69 | 2 | 4,35 | 0,05 |

(continua)

(conclusão)

| Código UniprotKB | Nome da proteína (Sigla) | Spot ID | Nível diferencial do Spot | n - 2 | T t | < |
|---|--|---------|---------------------------|-------|-------|-------|
| 2. Metabolismo | | | | | | |
| P31930 | Complexo citocromo bc1 subunidade 1 (QCR1) | 2443 | -4,17 | 4 | 4,07 | 0,02 |
| P60174 | Triose-fosfato isomerase (TPIS) | 1072 | 2,44 | 3 | 3,54 | 0,05 |
| | | 2843 | -2,44 | 3 | 3,54 | 0,05 |
| 3. Chaperonas moleculares/ proteínas heat shock | | | | | | |
| P14625 | Endoplasmina (ENPL) | 676 | - | 1 | 11,68 | 0,1 |
| P30101 | Proteína dissulfeto-isomerase A3 (PDIA3) | 665 | 2,75 | 4 | 10,66 | 0,001 |
| | | 2337 | -2,75 | 4 | 10,66 | 0,001 |
| Q15084 | Proteína dissulfeto-isomerase A6 (PDIA6) | 717 | 2,07 | 4 | 6,04 | 0,01 |
| | | 2413 | -2,07 | 4 | 6,04 | 0,01 |
| 4. Diferenciação e proliferação celular | | | | | | |
| P36955 | Fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF) | 2420 | -2,58 | 3 | 3,40 | 0,05 |
| 5. Proteína de Ligação | | | | | | |
| Q9NRV9 | Proteína Heme-binding (HEBP1) | 1092 | 2,55 | 2 | 5,24 | 0,05 |
| 6. Transporte | | | | | | |
| P02774 | Proteína de ligação da Vitamina D (VTDB) | 666 | 2,68 | 2 | 5,30 | 0,05 |
| | | 2317 | -2,68 | 2 | 5,30 | 0,05 |
| Q9P157 | Albumina (ALBU) | 756 | 2,47 | 4 | 2,92 | 0,05 |
| | | 2456 | -2,47 | 4 | 2,92 | 0,05 |
| | | 2302 | 6,53 | 3 | 2,40 | 0,1 |
| | | 1030 | - | 1 | 18,51 | 0,05 |
| | | 1075 | 2,29 | 4 | 2,18 | 0,1 |
| | | 720 | 4,17 | 4 | 4,07 | 0,02 |

FONTE: autor (2011)

NOTA: **Spot ID** - identificação do spot no gel. Os spots identificados no carcinoma ductal estão destacados em fundo cinza. **Nível diferencial do Spot** – valor referente à diferença no nível de expressão das proteínas em um tumor em relação ao outro, o valor negativo representa o nível de expressão diminuído. (-) spots presentes apenas no carcinoma ductal. **n** – número vezes que o spot estava presente nos géis referência. **Teste t** - teste *t* de Student.

APÊNDICE 02

Parâmetros utilizados para verificar a posição esperada da proteína

| Código UniprotKB | Nome da proteína (Sigla) | Spot ID | Tolerância (ppm) | ΔpI | ΔMM |
|------------------|--|---------|------------------|-------------|-------------|
| Q96HG5 | Actina Citoplasmática 1 (ACTB) | 886 | 100 | 0,52 | 4,76 |
| | | 2608 | 50 | 0,47 | 2,38 |
| | | 2530 | 40 | 0,77 | 4,76 |
| | | 2658 | 40 | 0,46 | 9,52 |
| P63261 | Actina Citoplasmática 2 (ACTG) | 886 | 100 | 0,5 | 4,99 |
| | | 2608 | 50 | 0,45 | 2,61 |
| | | 2530 | 40 | 0,76 | 4,51 |
| | | 2658 | 40 | 0,44 | 9,74 |
| Q9P157 | Albumina (ALBU) | 756 | 100 | 0,45 | 31,28 |
| | | 720 | 40 | 0,02 | 25,67 |
| | | 1075 | 40 | 0,14 | 63,53 |
| | | 2456 | 100 | 0,35 | 31,28 |
| | | 2302 | 100 | 0,44 | 14,44 |
| | | 1030 | 100 | 0,46 | 56,52 |
| P62736 | Alfa-actina, músculo liso aórtico (ACTA) | 829 | 100 | 0,79 | 1,65 |
| P61158 | Actina - relacionada a proteína 3 (ARP3) | 723 | 100 | 0,37 | 13,21 |
| P14625 | Endoplasmina (ENPL) | 676 | 100 | 0,12 | 38,44 |
| P31930 | Complexo citocromo bc1 subunidade 1 (QCR1) | 2443 | 40 | 0,89 | 6,02 |
| P36955 | Fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF) | 2420 | 50 | 0,08 | 7,76 |
| P52907 | F-actina-capping proteína de subunidade alfa-1 (CAZA1) | 925 | 100 | 0,34 | 15,15 |
| P30101 | Proteína dissulfeto-isomerase A3 (PDIA3) | 665 | 100 | 0,14 | 0,18 |
| | | 2337 | 50 | 0,08 | 3,33 |
| Q15084 | Proteína dissulfeto-isomerase A6 (PDIA6) | 2413 | 50 | 0,33 | 9,50 |
| | | 717 | 100 | 0,33 | 5,37 |
| Q9NRV9 | Proteína Heme-binding (HEBP1) | 1092 | 40 | 0,01 | 27,96 |
| P02774 | Proteína de ligação da Vitamina D (VTDB) | 666 | 50 | 0,05 | 2,75 |
| | | 2317 | 50 | 0,07 | 0,92 |
| P60174 | Triose-fosfato isomerase (TPIS) | 1072 | 40 | 0,13 | 4,09 |
| | | 2843 | 100 | 0,04 | 4,09 |
| P06753 | Tropomiosina cadeia alfa-3 (TPM3) | 995 | 100 | 0,16 | 0,61 |
| | | 2740 | 40 | 0,17 | 0,61 |

(continua)

(conclusão)

| Código UniprotKB | Nome da proteína (Sigla) | Spot ID | Tolerância (ppm) | ΔpI | ΔMM |
|------------------|-----------------------------------|---------|------------------|-------------|-------------|
| Q71U36 | Tubulina cadeia alfa-1A (TBA1A) | 886 | 100 | 0,87 | 21,10 |
| | | 658 | 100 | 0,4 | 12,43 |
| | | 2320 | 40 | 0,37 | 18,34 |
| P68363 | Tubulina cadeia alfa-1B (TBA1B) | 886 | 100 | 0,87 | 21,26 |
| | | 658 | 100 | 0,4 | 12,20 |
| | | 2320 | 40 | 0,37 | 18,11 |
| Q9BQE3 | Tubulina cadeia alfa-1C (TBA1C) | 886 | 100 | 0,85 | 20,79 |
| | | 658 | 100 | 0,38 | 12,87 |
| | | 2320 | 40 | 0,35 | 18,81 |
| P68366 | Tubulina cadeia alfa-4A (TBA4A) | 658 | 100 | 0,39 | 12,65 |
| | | 2320 | 40 | 0,36 | 18,58 |
| Q13748 | Tubulina cadeia alfa-3C/D (TBA3C) | 658 | 100 | 0,37 | 12,65 |
| | | 2320 | 40 | 0,34 | 18,58 |
| Q9NY65 | Tubulina cadeia alfa-8 (TBA8) | 658 | 100 | 0,36 | 12,43 |
| | | 2320 | 40 | 0,37 | 18,34 |
| Q6PEY2 | Tubulina cadeia alfa-3E (TBA3E) | 658 | 100 | 0,34 | 12,87 |
| | | 2320 | 40 | 0,31 | 18,81 |
| P07437 | Tubulina cadeia beta (TBB5) | 2443 | 40 | 1,05 | 0,00 |
| Q13885 | Tubulina cadeia beta-2A (TBB2A) | 2443 | 40 | 1,05 | 0,40 |
| Q9BVA1 | Tubulina cadeia beta-2B (TBB2B) | 2443 | 40 | 1,05 | 0,60 |
| P08670 | Vimentina (VIME) | 834 | 100 | 0,1 | 19,78 |

NOTA: **Tolerância ppm** – partes por milhão, tolerância utilizada na identificação de cada *spot*. Os parâmetros ΔMM e ΔpI foram utilizados com base no trabalho de DUPONT *et al.* (2005). Os parâmetros dos *spots* que diferiram da localização esperada no gel estão destacados em fundo cinza.

ANEXOS

| | | |
|----------|--|-----|
| ANEXO 01 | Interface do programa de busca MASCOT- PMF..... | 145 |
| ANEXO 02 | Exemplo de identificação protéica por PMF..... | 146 |
| ANEXO 03 | Dados complementares da identificação..... | 147 |
| ANEXO 04 | Interface do programa MASCOT para MS/MS..... | 148 |
| ANEXO 05 | Exemplo de identificação protéica por MS/MS..... | 149 |
| ANEXO 06 | Dados complementares da identificação MS/MS..... | 150 |

ANEXO 01 – Interface do programa de busca MASCOT - PMF

MASCOT Peptide Mass Fingerprint

| | | | |
|-------------------------------|--|----------------------------|---|
| Your name | <input type="text" value="Navara Oliveira"/> | Email | <input type="text" value="navbiom@yahoo.com.br"/> |
| Search title | <input type="text" value="Spot 2337"/> | | |
| Database(s) | <div> SwissProt NCBIInr contaminants cRAP MSDB </div> | Enzyme | <div> Trypsin </div> |
| | | Allow up to | <div> 1 missed cleavages </div> |
| Taxonomy | <div> Homo sapiens (human) </div> | | |
| Fixed modifications | <div> Carbamidomethyl (C) </div> | <div> > < </div> | <div> Acetyl (K) Acetyl (N-term) Acetyl (Protein N-term) Amidated (C-term) Amidated (Protein C-term) Ammonia-loss (N-term C) Biotin (K) Biotin (N-term) Carbamyl (K) Carbamyl (N-term) Carboxymethyl (C) </div> |
| | <div> Display all modifications </div> | | |
| Variable modifications | <div> Oxidation (M) </div> | <div> > < </div> | |
| Protein mass | <input type="text"/> kDa | Peptide tol. ± | <input type="text" value="50"/> ppm |
| Mass values | <div> <input checked="" type="radio"/> MH⁺ <input type="radio"/> M_r <input type="radio"/> M-H⁻ </div> | | |
| | <div> <input checked="" type="radio"/> Monoisotopic <input type="radio"/> Average </div> | | |
| Data file | <div> Escolher arquivo peaklist.xml </div> | | |
| Query | <div> NB Contents of this field are ignored if a data file is specified. </div> | | |
| Decoy | <input type="checkbox"/> | Report top | <div> AUTO hits </div> |
| <div> Start Search ... </div> | | <div> Reset Form </div> | |

ANEXO 02 – Exemplo de identificação protéica por PMF

MATRIX

SCIENCE

Mascot Search Results

User

: Nayara Oliveira

Email

: naybiom@yahoo.com.br

Search title

: Spot 2337

MS data file

: peaklist.xml

Database

: SwissProt 2011_01 (524420 sequences; 185205850 residues)

Taxonomy

: Homo sapiens (human) (20253 sequences)

Timestamp

: 4 Feb 2011 at 04:06:21 GMT

Top Score

: 194 for PDIA3_HUMAN, Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=4

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.

Protein scores greater than 56 are significant ($p < 0.05$).

| Protein Score | Number of Hits |
|---------------|----------------|
| 0 | 10 |
| 34 | 8 |
| 56 | 4 |
| 194 | 1 |

Concise Protein Summary Report

Format As

Concise Protein Summary

Help

Significance threshold p<

0.05

Max. number of hits

AUTO

Re-Search All

Search Unmatched

1.

PDIA3_HUMAN

Mass: 57146

Score: 194

Expect: 8.1e-16

Matches: 14

Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=4

IFT81_HUMAN

Mass: 80038

Score: 34

Expect: 9

Matches: 5

Intraflagellar transport protein 81 homolog OS=Homo sapiens GN=IFT81 PE=1 SV=1

TB15A_HUMAN

Mass: 5283

Score: 31

Expect: 18

Matches: 2

ANEXO 03 - Dados complementares da identificação por PMF

Mascot Search Results

Protein View

Match to: PDIA3_HUMAN Score: 194 Expect: 8.1e-16
 Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=4
 Found in search of peaklist.xml

Nominal mass (M₂): 57146; Calculated pI value: 5.98
 NCBI BLAST search of [PDIA3_HUMAN](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
 Variable modifications: Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: 17
 Number of mass values matched: 14
 Sequence Coverage: 33%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MRLRRLLALFP GVALLLAAAR LAAASDVLEL TDDNFESRIS DTGSAGLMVLV
51 EFFAPWCCHC KRLAPEYEA ATRLKGIIVPL AKVDCNTANT TCKNYGVSCY
101 PTLKIFRDCG EAGAYDGPRT ADGIVSHLKK QAGPASVPLR TEEEFKKFIS
151 DKDASIVGFF DDFSEAHSE FLKAAASNLRD NYRFAHTNVE SLVNEYDDNG
201 EGIILFRPSH LTNKFEDKTV AYTEQSMISG KIKKFIQENI PGICPHMTED
251 NKDLIQGKDL LIAYYVDVYE KNAKGSNIWR NRVMGVAKKF LDAGHKLNFA
301 VASRKTFSHE LSDFGLESTA GRIPVVAIRT AKGEKFMQSE EFSRDGKALE
351 RFLQDYFDGN LKRYLKSEPI PESNDGPKVQ VVAENFDEIV NNENKDVLEI
401 FYAPWCCHCK NLEPKYKELG EKLSKDPNIV IAKMDATAND VPSPYEVRGF
451 PTIYFSPANK KLNPKKVEGG RELSDFISYL QREATNPPVI QEEKPKKKKK
501 AQEDL
      
```

[Show predicted peptides also](#)

Sort Peptides By ☒ Residue Number ☐ Increasing Mass ☐ Decreasing Mass


| Start - End | Observed | Mr(expt) | Mr(calc) | ppm | Miss | Sequence |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----|------|-----------------------------|
| 63 - 73 | 1191.6078 | 1190.6005 | 1190.5931 | 6 | 0 | R.LAPEYEAATR.L |
| 95 - 104 | 1084.5269 | 1083.5196 | 1083.5601 | -37 | 0 | K.YGVSCYPTLK.I |
| 108 - 119 | 1236.5150 | 1235.5077 | 1235.5054 | 2 | 0 | R.DGEEAGAYDGPRT |
| 131 - 140 | 995.5627 | 994.5555 | 994.5560 | -1 | 0 | K.QAGPASVPLR.T |
| 153 - 173 | 2348.1594 | 2347.1521 | 2347.0645 | 37 | 0 | K.DASIVGFFDDFSEAHSEFLK.A |
| 259 - 271 | 1619.8254 | 1618.8182 | 1618.7766 | 26 | 0 | K.DLLIAYYVDVYEK.N |
| 297 - 304 | 877.5001 | 876.4928 | 876.4817 | 13 | 0 | K.LNFVASR.K |
| 306 - 329 | 2575.3662 | 2574.3589 | 2574.2966 | 24 | 0 | K.TFSHELSDFGLESTAGEIPVVAIRT |
| 336 - 344 | 1172.5472 | 1171.5400 | 1171.5332 | 6 | 0 | K.FVMQSEFSR.D |
| 352 - 362 | 1359.6643 | 1358.6570 | 1358.6507 | 5 | 0 | R.FLQDYFDGNLK.R |
| 352 - 363 | 1515.7771 | 1514.7698 | 1514.7518 | 12 | 1 | R.FLQDYFDGNLKR.Y |
| 434 - 448 | 1664.7833 | 1663.7760 | 1663.7512 | 15 | 0 | K.MDATANDVPSPYEVR.G |
| 449 - 460 | 1341.6666 | 1340.6593 | 1340.6765 | -13 | 0 | R.GFPTIYFSPANK.K |
| 472 - 482 | 1370.7162 | 1369.7089 | 1369.6878 | 15 | 0 | R.ELSDFISYLQR.E |

No match to: 855.0132, 1639.7557, 2752.4565

ANEXO 04 - Interface do programa MASCOT para MS/MS

| MASCOT MS/MS Ions Search | | | | | |
|---|---|-------------------------|--|---|-------------------------------------|
| Your name | <input type="text" value="Nayara Oliveira"/> | | Email | <input type="text" value="naybiom@yahoo.com.br"/> | |
| Search title | <input type="text" value="Spot 2843"/> | | | | |
| Database(s) | <div> <div>Invertebrates_EST</div> <div>Human_EST</div> <div>Fungi_EST</div> <div>Environmental_EST</div> <div>SwissProt</div> </div> | | Enzyme | <input type="text" value="Trypsin"/> | |
| | | | Allow up to | <input type="text" value="1"/> missed cleavages | |
| | | | Quantitation | <input type="text" value="None"/> | |
| Taxonomy | <input type="text" value="..... Homo sapiens (human)"/> | | | | |
| Fixed modifications | <div> <div>Carbamidomethyl (C)</div> </div> | | <div> <div>Acetyl (K)</div> <div>Acetyl (N-term)</div> <div>Acetyl (Protein N-term)</div> <div>Amidated (C-term)</div> <div>Amidated (Protein C-term)</div> <div>Ammonia-loss (N-term C)</div> <div>Biotin (K)</div> <div>Biotin (N-term)</div> <div>Carbamyl (K)</div> <div>Carbamyl (N-term)</div> <div>Carboxymethyl (C)</div> </div> | | |
| | <input type="checkbox"/> Display all modifications | | | | |
| Variable modifications | <div> <div>Oxidation (M)</div> </div> | | | | |
| Peptide tol. ± | <input type="text" value="100"/> ppm | # ¹³C | <input type="text" value="0"/> | MS/MS tol. ± | <input type="text" value="0.6"/> Da |
| Peptide charge | <input type="text" value="1+"/> | | Monoisotopic | <input checked="" type="radio"/> Average <input type="radio"/> | |
| Data file | <input type="button" value="Escolher arquivo"/> peaklist.xml | | | | |
| Data format | <input type="text" value="Bruker (.XML)"/> | | Precursor | <input type="text" value="2192.48"/> m/z | |
| Instrument | <input type="text" value="MALDI-TOF-TOF"/> | | Error tolerant | <input type="checkbox"/> | |
| Decoy | <input type="checkbox"/> | | Report top | <input type="text" value="AUTO"/> hits | |
| <input type="button" value="Start Search ..."/> | | | <input type="button" value="Reset Form"/> | | |

ANEXO 05 - Exemplo de identificação protéica por MS/MS

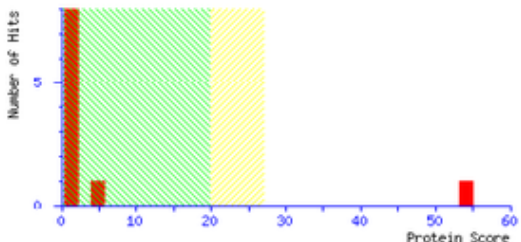


Mascot Search Results

User : Mayara Oliveira
 Email : maybiom@yahoo.com.br
 Search title : Spot 2843
 MS data file : peaklist.xml
 Database : SwissProt 2011_01 (524420 sequences; 185205850 residues)
 Taxonomy : Homo sapiens (human) (20253 sequences)
 Timestamp : 4 Feb 2011 at 04:23:33 GMT
 Protein hits : [TPIS_HUMAN](#) Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TPI1 PE=1 SV=2

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Individual ions scores > 20 indicate peptides with significant homology.
 Individual ions scores > 27 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
 Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As: Peptide Summary [Help](#)

Significance threshold $p <$ 0.05
 Max. number of hits AUTO

Standard scoring ☒ MudPIT scoring ☐ Ions score or expect cut-off 0
 Show sub-sets 0

Show pop-ups ☒ Suppress pop-ups ☐ Sort unassigned Decreasing Score
 Require bold red ☐

☐ Error tolerant

1. [TPIS_HUMAN](#) Mass: 26938 Score: 54 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
 Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TPI1 PE=1 SV=2

☐ Check to include this hit in error tolerant search

| Query | Observed | Mr(expt) | Mr(calc) | ppm | Miss | Score | Expect | Rank | Unique | Peptide |
|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|--------|------|-------|--------|------|--------|-------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> 1 | 2192.0000 | 2190.9927 | 2191.0620 | -31.60 | 0 | 54 | 0.0001 | 1 | U | K.VPADTEWCAPTTAYIDFAR.Q |

ANEXO 06 - Dados complementares da identificação MS/MS

